

**Über die kinetischen Eigenschaften  
verschiedener Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels  
in der Leber fötaler und neugeborener Ratten**

Günter Tömm

1976







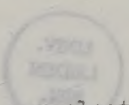
Aus der Kinderklinik im Dr.v.Haunerschen Kinderspital  
der Universität München

Vorstand: Prof.Dr.med. Klaus Betke

Über die kinetischen Eigenschaften  
verschiedener Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels  
in der Leber fötaler und neugeborener Ratten

INAUGURAL-DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
in der gesamten Medizin  
an der Ludwig Maximilians-Universität  
zu München



vorgelegt  
von

Günter Tomm  
aus  
München

1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Priv.Doiz.Dr.med.Jürgen Schaub

Mitberichterstatter: Prof.Dr.med.Klaus Betke

Dekan: Prof.Dr.med.Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.Juli 1976



Herrn Prof.Dr.med.Klaus B e t k e möchte ich für die freundliche Überlassung eines Arbeitsplatzes an der Kinderklinik der Universität München im Dr.v.Haunerschen Kinderspital herzlich danken.

Herrn Priv.Doiz.Dr.med.Jürgen S c h a u b gilt mein besonderer Dank. Er überließ mir das Dissertationsthema,gab mir manche Anregung und stand mir zu jeder Zeit mit Seinem Rat zur Seite.

Frau Isabella B e c k e r möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen für Ihre Geduld,mit der Sie mich mit den labortechnischen Einrichtungen und dem Arbeiten in einem biochemischen Labor vertraut machte,und für Ihre wertvolle Mitarbeit bei der Durchführung der Experimente.

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. EINLEITUNG.....                                                                          | 1  |
| Entwicklung der Hexokinase und Glukokinase.....                                             | 2  |
| Entwicklung der untersuchten Enzyme und ihre Stellung<br>im Kohlenhydratstoffwechsel.....   | 3  |
| 2. MATERIAL und METHODIK.....                                                               | 7  |
| Vereinfachtes Schema des Kohlenhydratstoffwechsels....                                      | 9  |
| Verwendete Substrate und deren Konzentrationen im Test                                      | 14 |
| Prinzip und Beispiel aus der Versuchsreihe zur Be-<br>stimmung der Michaelis-Konstante..... | 15 |
| Substrat-Aktivitätskurve.....                                                               | 16 |
| Lineweaver-Burk-Diagramm.....                                                               | 18 |
| Statistische Methoden.....                                                                  | 19 |
| 3. ERGEBNISSE.....                                                                          | 21 |
| $K_m$ der G-6-PDH.....                                                                      | 22 |
| $K_m$ der 6-P-GDH.....                                                                      | 23 |
| $K_m$ der PGI.....                                                                          | 24 |
| $K_m$ der PGM.....                                                                          | 25 |
| $K_m$ der F-1,6-DPase.....                                                                  | 26 |
| $K_m$ der F-6-PK.....                                                                       | 27 |
| $K_m$ der Phosphorylase opt.....                                                            | 28 |
| $K_m$ der Phosphorylase n.Hers mit AMP.....                                                 | 29 |
| $K_m$ der Phosphorylase n.Hers ohne AMP.....                                                | 30 |
| $K_m$ der Gesamtglykogensynthetase.....                                                     | 31 |
| $K_m$ der G-6-Pase.....                                                                     | 32 |
| $K_m$ der $\alpha$ -Glukosidase.....                                                        | 33 |
| $K_m$ der Amylo-1,6-Glukosidase.....                                                        | 34 |
| 4. DISKUSSION.....                                                                          | 35 |
| Optimale Substratkonzentrationen für oben genannte<br>Enzyme.....                           | 37 |
| Michaelis-Konstanten aller untersuchten Enzyme in<br>einer Tabelle.....                     | 40 |
| 5. ZUSAMMENFASSUNG.....                                                                     | 43 |
| 6. LITERATUR.....                                                                           | 45 |
| 7. LEBENS LAUF.....                                                                         | 47 |

Im intrauterinen Leben eines menschlichen oder tierischen Organismus stellt die Plazenta eine für den Föt unentbehrliche Stoffwechselbrücke zum mütterlichen Kreislauf dar. Sie vollbringt als Atmungs-, Ernährungs- und Ausscheidungsorgan des Föten Stoffwechselleistungen, die postnatal unverzüglich von den manchmal noch unreifen Organen des Neugeborenen übernommen werden müssen. Die Umstellung vom intrauterinen zum extrauterinen Leben schafft für das Neugeborene ungewohnte Verhältnisse und zum Teil völlig neue Aufgaben, die sich in utero erübrigten.

Während z.B. der Föt via Plazenta mit einem gleichmäßig fließenden Glukosestrom von der Mutter versorgt und damit seine Blutglukose auf einem konstanten Pegel gehalten wird, muß die Leber des Neugeborenen die Fähigkeit besitzen, durch Glykogenolyse oder Glukoneogenese Glukose ins Blut abzugeben, da die in den ersten Tagen mit der Milch aufgenommene Kohlenhydratmenge zur Aufrechterhaltung des Blutglukosespiegels nicht ausreicht. Diese Aufgabe kann das Neugeborene nur mit Hilfe eines gegenüber dem fötalen Leben veränderten Enzymmusters in der Leberzelle erfüllen. Tatsächlich unterscheidet sich die Leber eines Neugeborenen hinsichtlich der Enzymausstattung von der Leber eines Föten auf vielen Schritten des Kohlenhydratstoffwechsels. Das Enzymmuster eines Adulten wiederum weicht von dem eines Föten bzw. eines Neugeborenen ab. (2,4,10,11,14,19).

Die Labilität der Glukoseregulation zeigt sich in den nicht selten vorkommenden Hypoglykämien bei Neugeborenen und Säuglingen, die aber meist vorübergehender Natur sind, bis die Leber in der postnatalen Anpassungszeit die Fähigkeit erworben hat, die komplizierten Enzymsysteme in voller Aktivität zur Verfügung zu stellen. Besonders Frühgeborene und sogenannte "small for date babies" neigen zu schweren, behandlungsbedürftigen Hypoglykämien. Auch kommt es bei ihnen oft zu einem Ikterus prolongatus, der im Gegensatz zum physiologischen Ikterus simplex die Gefahr eines Kernikterus mit sich bringt.

Diese drei Beispiele - die Hypoglykämie, der Ikterus prolongatus und auch der "physiologische" Ikterus neonatorum simplex - sind als Ausdruck einer "Unreife der Leber" zum Zeitpunkt der Geburt zu werten. Sie sind somit Folgeerscheinungen einer verminderten oder fehlenden Aktivität von Enzymen in der neonatalen Leberzelle.

Es ist bekannt, daß sich die Aktivitäten vieler Leberenzyme des Kohlenhydratstoffwechsels während der pränatalen und postnatalen Entwicklung ändern(2,11,14). Einige Enzyme erscheinen erst zur Geburt oder kurz danach, andere nehmen genau zum Geburtstermin in ihrer Aktivität ab und viele werden durch die Umstellung vom intrauterinen zum extrauterinen Leben nicht oder nicht signifikant beeinflusst. Man unterscheidet zwei Gruppen von Enzymen: Die eine wird durch den Geburtsvorgang induziert, die andere erscheint unabhängig vom Geburtstermin(14).

Während der verschiedenen Entwicklungsperioden des Organismus kann sich nicht nur die Aktivität eines Enzyms ändern, sondern auch die Affinität des Enzyms zu seinem Substrat, welche am besten durch die sogenannte Michaelis-Menten-Konstante ausgedrückt wird(8). Die so bezeichnete  $K_m$  ist eine individuelle Konstante mit der Dimension einer Konzentration (z.B. Mol/l) und hat zell- und organspezifischen Charakter. Verändert sich diese Michaelis-Konstante, gemessen unter standardisierten Bedingungen, zu irgendeinem Zeitpunkt des Reifungsprozesses signifikant, so darf man annehmen, daß die Leber aus biologisch erforderlichen Gründen ein neues Enzymprotein zur Katalyse derselben Reaktion synthetisiert hat.

Ein Beispiel hierzu bietet die Entwicklung der beiden Leberenzyme Hexokinase und Glukokinase, die die Phosphorylierung der Glukose katalysieren. Walker fand in der fötalen Leber von Meerschweinchen allein die Hexokinase mit einer  $K_m$  für Glukose von ungefähr  $3 \times 10^{-5} M$ , während er in der adulten Leber neben der Hexokinase noch ein wesentlich aktiveres Enzym, die Glukokinase, mit einer  $K_m$  für Glukose von ungefähr  $3-4 \times 10^{-3} M$  entdeckte(16). Ballard bestätigte mit seinen Untersuchungen an Hand von Ratten- und Schafslebern die Ergebnisse von Walker(1,2). Mit Hilfe der Michaelis-Konstante können die beiden Formen des Enzyms voneinander unterschieden und in ihrer Funktion verstanden werden. Die Glukokinase ist spezifisch für Glukose und hat eine  $K_m$  für Glukose von annähernd 10mM. Diese Konzentration, welche einem Äquivalent von 180mg Glukose/100ml Blut entspricht, stellt genau jene Konzentration dar, bei der die Leber gewöhnlich Glukose zur Speicherung als Glykogen oder zum Aufbau von Fett aus dem Blut zu entfernen beginnt.

Eine Michaelis-Konstante in dieser Größe erlaubt also eine Kontrolle der Glukoseregulation (1,2,18). Es ist verständlich, daß der Föt einen derartigen Mechanismus nicht benötigt, da er ja in der Regel einen konstanten Blutglukosespiegel besitzt. Deshalb überrascht es nicht, daß die spezifische Glukokinase in der fötalen Leber nicht vorhanden ist. Die Hexokinase dagegen ist, wie schon oben erwähnt, sowohl in der fötalen als auch in der adulten Leber mit einer  $K_m$  für Glukose von circa 0,05 mM vertreten. Das bedeutet, daß das Enzym schon bei sehr niedrigen Glukosekonzentrationen aktiv ist.

Man darf somit annehmen, daß das Auftreten der Glukokinase in der adulten Leber verschiedener Säugetiere auf Grund der Kinetik eine De novo Synthese eines Enzymproteins darstellt. (18,19).

#### Die Entwicklung der untersuchten Enzyme und ihre Stellung im Kohlenhydratstoffwechsel.

Der Glukoseabbau wird durch Katalyse der Hexokinase bzw. der Glukokinase eingeleitet. Auf den nächsten zwei Abbauschritten erfolgt die Katalyse durch die Phosphoglukoisomerase und die monofunktionelle Fruktose-6-phosphokinase. Diese Enzyme sind in der fötalen Rattenleber schon frühzeitig aktiv. Dabei verbleiben die Aktivitäten der Phosphoglukoisomerase und Fruktose-6-phosphokinase auch post partum ungefähr auf demselben Stand, während die Hexokinase postnatal kontinuierlich bis zum 21. Lebenstag abfällt. (4,11,14). Die Funktion der Hexokinase, deren Aktivität in der fötalen Leber etwa dreimal höher als in der adulten liegt, wird nun anscheinend von einem erst ab dem 16. Lebenstag nachzuweisenden Isoenzym, der Glukokinase, übernommen. Sie erreicht ihre volle Aktivität bereits am 30. Lebenstag. (4,18,19). J a m d a r und G r e e n g a r d konnten durch eine kombinierte Verabreichung von Hydrocortison und Glukose die Erstaktivierung der Glukokinase um eine Woche vorverlegen. Mit Hydrocortison oder Glukose allein gelang dies nicht. Mit Östradiol wurde sowohl die sich normal entwickelnde Glukokinase als auch die durch Hydrocortison- und Glukosegabe vorzeitig hervorgerufene Glukokinase gehemmt. (4). S i g m a n und Mitarbeiter konnten in der Stärke-Gel-Elektrophorese vier verschiedene Molekularformen der Hexokinase nachweisen, die nacheinander in der Fötalzeit auftreten. Außerdem

fanden sie in der Rattenleber zwei elektrophoretisch unterschiedliche Banden der Glukokinase vor, von der die eine Bande schon nach dem 18. Fötaltag auftrat, während die zweite Form erst ab dem 16. Lebenstag nachweisbar war (10). W a l k e r stellte fest, daß die Glukokinase wesentlich schneller aktiviert wird, wenn die Ratten in der Phase der normalen Glukokinaseentwicklung drei Tage lang hungerten und anschließend wieder regelmäßig gefüttert wurden (18, 19). Eine Abhängigkeit des Erstauftretens der Glukokinase von der Zusammensetzung der Nahrung wurde ebenfalls beobachtet. (17).

Viele Untersuchungen bestätigten, daß große Mengen von Glykogen hauptsächlich in der Leber, aber auch in anderen Organen von Säugetieren pränatal abgelagert werden. Diese Glykogenspeicherung nimmt meist kurz vor der Geburt rasch zu. (2, 9). S h e l l e y beobachtete, daß die Glykogenspeicher der fötalen Leber von Spezies mit einer relativ langen Schwangerschaftsdauer wie z.B. bei Menschen, Affen und Schafen schon ziemlich früh und mit einer konstanten Geschwindigkeit aufgefüllt werden. Dagegen wird das Leberglykogen bei Föten von Spezies mit einer kurzen Gestation wie z.B. bei Kaninchen, Hunden, Meerschweinchen und Ratten erst im letzten Fünftel des Trächtigkeitsalters mit einer besonders bei Ratten ungeheuer großen Tagesdosis angehäuft (9). Diesen Befunden entsprechend beobachtet man zum Geburtstermin auch eine Zunahme der Aktivitäten der an der Glykogensynthese beteiligten Phosphoglukomutase und Glykogensynthetase (2, 11, 14). Postnatal fällt im Gegensatz zur Phosphoglukomutase die Aktivität des zur Glykogensynthese notwendigen Einwegkatalysators, der Glykogensynthetase, um mehr als ein Drittel ab. (11). Nach der Geburt fällt das pränatal gespeicherte Leberglykogen innerhalb weniger Stunden bei allen oben erwähnten Spezies auf wenige Prozent des Ausgangswertes ab (2, 9). Diese Reaktion ist für das Neugeborene lebensnotwendig, weil es den Geburtsvorgang selbst und die ungeschützte extrauterine Lebenslage nur durch erhöhte Stoffwechselleistungen, die mit einer vermehrten Glukoseutilisation einhergehen, kompensieren kann. Die bifunktionellen Enzyme Amylo-1,6-Glukosidase und Phosphoglukomutase nehmen in ihrer Aktivität bis zum Geburtstermin ständig zu und stehen

somit für die Glykogenolyse voll zur Verfügung. (2,11,14). Die Aktivität des in vivo wichtigen Einwegkatalysators Phosphorylase nimmt parallel zur Entwicklung der die Glykogensynthese fördernden Enzyme im letzten Viertel der Schwangerschaft bis zum 3. Lebenstag zu und stellt sich dann auf den erreichten Wert ein (2,11). Der Anstieg der Phosphorylase wird vielleicht durch eine Zunahme der Adrenalin- und Glukagonsekretion induziert. (2). S c h a u b fand, daß Glukagon bei neugeborenen Ratten sowohl die Phosphorylase induziert als auch die Glykogensynthetase inhibiert. (12). Möglicherweise läßt sich dadurch auch die post partum verminderte Aktivität der Glykogensynthetase erklären.

Die wichtigen Einwegsenzyme der Glukoneogenese, die Fruktose-1,6-diphosphatase und Glukose-6-phosphatase, sind pränatal nicht oder nur in geringem Ausmaße aktiv (2,11,14). Das Neugeborene aber besitzt ein für die Glukoneogenese bereits voll verfügbares Enzymmuster (Pyruvatcarboxylase, Phosphoenolpyruvat, Fruktose-1,6-diphosphatase und Glukose-6-phosphatase). (2,14).

B a l l a r d sieht die Geburt als den physiologischen Stimulus für das Erscheinen der glukoneogenetischen Enzyme an. (2). Mit der Tatsache, daß dem Neugeborenen die Glukose-6-phosphatase in ihrer ganzen Aktivität zur Verfügung steht, ist der entscheidende Mechanismus zur Konstanterhaltung des Blutglukosespiegels hergestellt, da die Glukose-6-phosphatase die letzte und entscheidende Reaktion der Glukoneogenese katalysiert. Es ist z.B. eine hereditäre Enzymopathie des Menschen (van Gierke, Glykogenose Typ I) bekannt, bei der ein Glukose-6-phosphatasemangel eine übermäßige Speicherung von Glykogen in der Leber und eine ständige Hypoglykämie verursacht.

Die in den Pentosephosphatzyklus führenden Enzyme, die Glukose-6-phosphatdehydrogenase und die 6-Phosphoglukonatdehydrogenase, zeigen in der fötalen und neonatalen Leber höhere Aktivitäten als in der adulten Leber. (11,14).

An den Abbauwegen sind nicht immer die Enzyme des Aufbauges beteiligt. Das bedeutet, daß einige Enzyme eine Reaktion in beiden Richtungen katalysieren, andere hingegen nur in einer. Solche Einwegkatalysatoren werden auch Schlüsselenzyme genannt, weil sie durch ihre Funktionen einen irreversiblen Stoffwechselweg aufschließen.

Zu solchen Schlüsselenzymen zählen in der Glykogensynthese die Glykogensynthetase, in der Glykogenolyse die Phosphorylase, in der Glukoneogenese die Fruktose-1,6-diphosphatase wie auch die Glukose-6-phosphatase und schließlich in der Glykolyse die Fruktose-6-phosphokinase. Die Anwesenheit dieser Enzyme ist also eine Voraussetzung für das "Aufschließen" der einzelnen Stoffwechselrichtungen. So ist z.B. eine Glukoneogenese im Lebergewebe von fötalen Ratten noch nicht oder nur in ganz geringem Ausmaße möglich, da die beiden Schlüsselenzyme, die Fruktose-1,6-diphosphatase und die Glukose-6-phosphatase, vor der Geburt kaum, sondern erst postnatal in ihrer vollen Aktivität zur Verfügung stehen (2,11,14).

Eine zentrale und bedeutende Stellung im Kohlenhydratstoffwechsel nimmt als Substrat und Produkt der verschiedenen Auf- und Abbauewege das Glukose-6-phosphat ein. Diese stoffwechselaktive Form der Glukose hat über die Phosphoglukomutase Zugang zum Glykogenaufbau, kann mit Hilfe der Glukose-6-phosphatdehydrogenase in den Pentosephosphatzzyklus eingeschleußt sowie über die Phosphoglukoisomerase auf den glykolytischen Weg gebracht werden. Schließlich kann das Glukose-6-phosphat als Metabolit der Glukoneogenese wie auch der Glykogenolyse durch die Glukose-6-phosphatase zu Glukose verstoffwechselt werden.

In der folgenden Arbeit wurde an fötalen und neugeborenen Ratten die Frage untersucht, inwieweit die Ontogenese die kinetischen Eigenschaften verschiedener Leberenzyme des Kohlenhydratstoffwechsels beeinflußt. Weiter wurde geprüft, ob die für adulte Rattenlebern festgelegten Testansätze in Bezug auf ihre Substratkonzentrationen auch für Lebergewebe von fötalen und neugeborenen Ratten geeignet sind, da man für Enzymbestimmungen in bestimmten Geweben (Blut, Muskel, Leber etc.) unterschiedliche optimale Substratkonzentrationen benötigt. (13,15).

## Material und Methodik

Als Versuchstiere wurden männliche und weibliche Wistar-Ratten vom Stamm AF/Han (bezogen vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht in 3 Hannover Linden, Lettow-Vorbeck-Allee 57) verwendet. Die erwachsenen Tiere hatten ein Gewicht von 250-300g. Sie erhielten die Standard-Diät Altromin und Wasser ad libitum. Ein Männchen und ein Weibchen wurden für 24 Stunden zur Paarung zusammengebracht. Als Termin der möglichen Befruchtung wurde Mitternacht 0°°Uhr angenommen. Dieser Zeitpunkt diente unter täglicher Beobachtung des Weibchen zur Bestimmung des Trächtigkeitsalters. Der Wurf eines Weibchen enthielt zwischen fünf und elf Neugeborene, meistens jedoch zehn. Sogenannte "Small for dates" wurden verworfen.

Die Muttertiere wurden durch Dekapitation getötet, die Föten aus den Uterushörnern herausgenommen und ebenfalls durch Dekapitation getötet. Die Tiere wurden soweit wie möglich entblutet, die excidierten Lebern auf einem Filterpapier nochmals abgetupft und anschließend sofort in eine mit Trockeneis gefüllte Thermosflasche gelegt. Entweder wurden die Lebern umgehend bei 0°C homogenisiert oder bis zur Analyse in einem Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt. Die Lebern vom 15. und 16. Fötaltag wurden gepoolt, wobei beachtet wurde, daß alle Föten dieselbe Größe hatten. Die neugeborenen Ratten wurden ebenfalls dekapiert und vor der Leberentnahme entblutet. Eine Leber reichte bei den Neugeborenen und den Föten vom 22. bzw. 23. Fötaltag für die verschiedenen Enzymassays aus. Zwischen männlichen und weiblichen Tieren wurde nicht unterschieden.

Insgesamt wurden für die Experimente etwa 20 trächtige Ratten, 120 Föten und 60 neugeborene Ratten benötigt.

Analysiert wurden

1. Enzyme der Glykogensynthese: Phosphoglukomutase, Glykogensynthetase.
2. Enzyme der Glykogenolyse: Phosphorylase, Phosphoglukomutase, außerdem die lysosomalen Enzyme  $\alpha$ -Glukosidase und Amylo-1,6-glukosidase.
3. Enzyme der Glukoneogenese: Fruktose-1,6-diphosphatase, Phosphoglukoisomerase und Glukose-6-phosphatase.
4. Enzyme der Glykolyse: Phosphoglukoisomerase, Fruktose-6-phosphokinase.
5. Enzyme des Pentosephosphatzyklus: Glukose-6-phosphatdehydrogenase und 6-Phosphoglukonatdehydrogenase.

Die Homogenisation des Lebergewebes erfolgte im Ultraschall-homogenisator ( B r a n s o n sonifier B 10 Mikrospritze ) mit folgenden Puffern:

Destilliertes Wasser für die Bestimmung der  $\alpha$ -Glukosidase und Amylo-1,6-glukosidase. Verdünnung Gewebe/Homogenisat 1:100.

Saccharose 0,4 M, EDTA 0,005 M, pH 7,0 zur Bestimmung der Glykogensynthetase. Verdünnung Gewebe/Homogenisat 1:10-1:30.

Saccharose 0,4 M, EDTA 0,005 M, pH 7,0 für die Bestimmung der G6Pase und der Phosphorylase ( Messung des anorganischen Phosphors ). Verdünnung Gewebe/Homogenisat 1:100.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M, EDTA 0,01 M, pH 7,3 zur Bestimmung von Phosphorylase, G6PDH, 6PGDH, PGI, PGM und F1,6DPase. Verdünnung Gewebe/Homogenisat 1:10.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M, EDTA 0,01 M, pH 7,6 für die Bestimmung der F6PK. Verdünnung Gewebe/Homogenisat 1:10.

Der Extrakt wurde bei 1950 g und 0°C für 30 Minuten zentrifugiert, um größere Partikel zu entfernen. Die Enzyme wurden im Überstand gemessen.

Nach B ü c h e r gibt es für die Bestimmung eines spezifischen Enzymproteins drei verschiedene Meßarten: die Messung der molekularen Konzentration, des Gewichts und der katalytischen Aktivität (20). Eine weitere wirksame Methode zur Bestimmung eines spezifischen Enzymproteins stellt die heute sehr gebräuchliche Elektrophorese dar.

Für die Praxis ist die Messung der Aktivität eines Enzyms im Gewebe, Plasma oder in Exkretionssäften von Bedeutung. Man bedient sich also der Fähigkeit eines Enzyms, bestimmte chemische Reaktionen zu katalysieren, um es zu messen. Die Geschwindigkeit, mit der die Reaktion abläuft, stellt das Maß der Enzymaktivität dar. Enzymaktivitäten können grundsätzlich auf drei verschiedenen Wegen gemessen werden:

1. Durch den Verbrauch eines von der Reaktion umgesetzten Substrates.

|            |                                          |
|------------|------------------------------------------|
| PK         | Pyruvatkinase                            |
| TCA        | Trichloressigsäure                       |
| TIM        | Triosephosphatisomerase                  |
| TRA        | Triäthanolaminhydrochlorid               |
| TRIS       | Trihydroxymethylaminomethan              |
| UDPG       | Uridindiphosphoglukose                   |
| UDPG-PPase | Uridindiphosphoglukose-pyrophosphorylase |

In der folgenden Abbildung sind die untersuchten Enzyme unterstrichen.

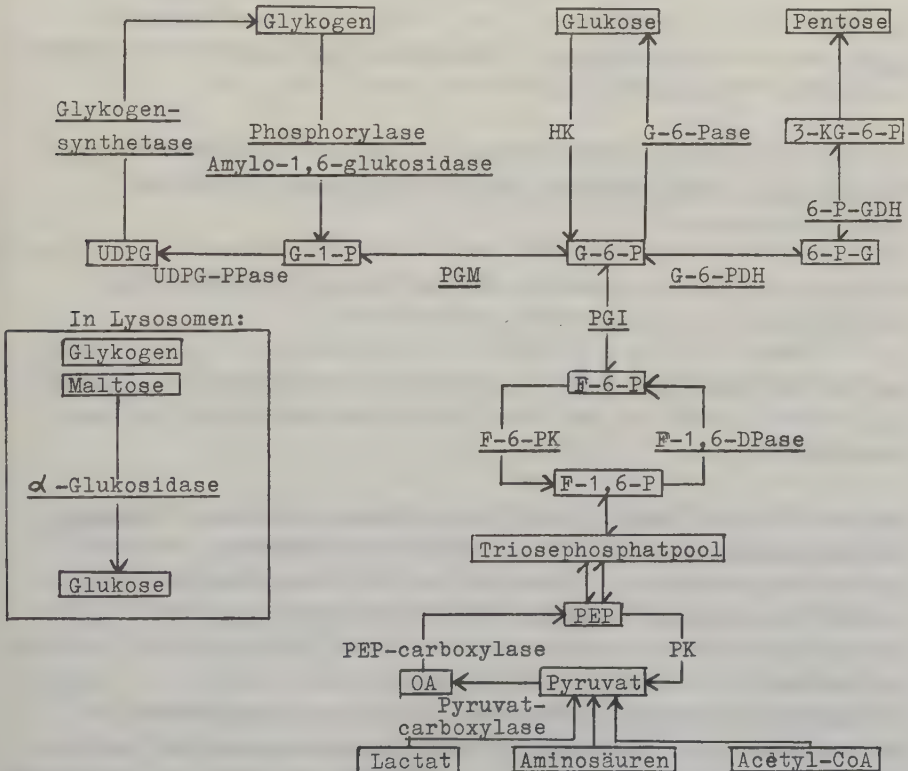


Abb.1: Vereinfachtes Schema des Kohlenhydratstoffwechsels unter besonderer Berücksichtigung der in der Arbeit analysierten Enzyme(in der Abbildung unterstrichen).

Die Homogenisation des Lebergewebes erfolgte im Ultraschall-homogenisator ( B r a n s o n sonifier B 10 Mikrospritze ) mit folgenden Puffern:

Destilliertes Wasser für die Bestimmung der  $\alpha$ -Glukosidase und Amylo-1,6-glukosidase. Verdünnung Gewebe/Homogenisat 1:100.

Saccharose 0,4 M, EDTA 0,005 M, pH 7,0 zur Bestimmung der Glykogensynthetase. Verdünnung Gewebe/Homogenisat 1:10-1:30.

Saccharose 0,4 M, EDTA 0,005 M, pH 7,0 für die Bestimmung der G6Pase und der Phosphorylase ( Messung des anorganischen Phosphors ). Verdünnung Gewebe/Homogenisat 1:100.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M, EDTA 0,01 M, pH 7,3 zur Bestimmung von Phosphorylase, G6PDH, 6PGDH, PGI, PGM und F1,6DPase. Verdünnung Gewebe/Homogenisat 1:10.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M, EDTA 0,01 M, pH 7,6 für die Bestimmung der F6PK. Verdünnung Gewebe/Homogenisat 1:10.

Der Extrakt wurde bei 1950 g und 0°C für 30 Minuten zentrifugiert, um größere Partikel zu entfernen. Die Enzyme wurden im Überstand gemessen.

Nach B ü c h e r gibt es für die Bestimmung eines spezifischen Enzymproteins drei verschiedene Meßarten: die Messung der molekularen Konzentration, des Gewichts und der katalytischen Aktivität (20). Eine weitere wirksame Methode zur Bestimmung eines spezifischen Enzymproteins stellt die heute sehr gebräuchliche Elektrophorese dar.

Für die Praxis ist die Messung der Aktivität eines Enzyms im Gewebe, Plasma oder in Exkretionssäften von Bedeutung. Man bedient sich also der Fähigkeit eines Enzyms, bestimmte chemische Reaktionen zu katalysieren, um es zu messen. Die Geschwindigkeit, mit der die Reaktion abläuft, stellt das Maß der Enzymaktivität dar. Enzymaktivitäten können grundsätzlich auf drei verschiedenen Wegen gemessen werden:

1. Durch den Verbrauch eines von der Reaktion umgesetzten Substrates.

2. Durch die Bildung eines aus der Reaktion entstandenen Produktes.
3. Durch den Umsatz eines an der Enzymreaktion beteiligten Co-fermentes (z.B. NAD/NADP-abhängige Reaktionen). (7).

In der vorliegenden Arbeit wurde die zweite und dritte Möglichkeit zur Messung der Enzymaktivitäten herangezogen.

Die nachstehenden Enzyme wurden mit dem optischen Test in einem Eppendorf-Photometer bei 366 nm und 25°C mit Standardmethoden bestimmt. Zur Ermittlung der Michaelis-Konstante wurden mindestens fünf verschiedene Substratkonzentrationen verwendet. (21,22).

- G6PDH: TRA 50 mM, EDTA 5 mM, NADP 1 mM, pH 7,6  
G-6-P: 0,05 mM, 0,10 mM, 0,15 mM.....0,60 mM.
- 6PGDH: TRA 50 mM, EDTA 5 mM, MgSO<sub>4</sub> 8 mM, NADP 1 mM, pH 7,6  
6-P-G: 0,02 mM, 0,04 mM, 0,05 mM, 0,10 mM.....0,20 mM.
- PGI: TRA 50 mM, EDTA 5 mM, NADP 0,5 mM, G6PDH 5 µg, pH 7,6  
F-6-P: 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM.....1,2 mM.
- PGM: TRA 50 mM, EDTA 5 mM, MgSO<sub>4</sub> 8 mM, NADP 1 mM,  
Cysteinchlorid 10 mM, G-1,6-P 0,02 mM, G6PDH 5 µg,  
pH 7,6  
G-1-P: 0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM.....1,0 mM.
- F1,6DPase: TRA 50 mM, EDTA 1 mM, MgSO<sub>4</sub> 20 mM, NADP 0,5 mM,  
Cysteinchlorid 5 mM, G6PDH 2,5 µg, PGM 25 µg,  
pH 7,2  
F-1,6-DP: 0,01 mM, 0,02 mM, 0,025 mM.....0,10 mM.
- F6PK: TRA 50 mM, EDTA 5 mM, MgSO<sub>4</sub> 8 mM, KCl 200 mM,  
NADH 0,2 mM, ATP 2 mM, KCN 0,03 mM, Ald 50 µg,  
TIM 10 µg, GDH 1 µg, pH 7,6  
F-6-P: 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM.....1,2 mM.
- Phosphorylase: TRA 50 mM, EDTA 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM,  
NADP 0,5 mM, Cysteinchlorid 10 mM, AMP 2 mM,  
G-1,6-P 0,2 mM, G6PDH 2,5 µg, PGM 5 µg, pH 7,6  
Glykogen: 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml,.....0,6 mg/ml.

Die Glykogensynthetase wurde bestimmt nach L e l o i r und G o l d e m b e r g (23) mit einigen Modifikationen. Verdünnung Gewebe/Homogenisat 1:10 - 1:30. 20  $\mu$ l Homogenisat und 100  $\mu$ l Substrat ( TRIS 50 mM, EDTA 5 mM,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  20 mM, G-6-P 10 mM, Glykogen 1%, pH 8,2, UDPG: 1,66 mM, 3,33 mM.....8,33 mM ) wurden für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen in heißem Wasser abgestoppt. Das entstandene UDP wurde gemessen ( TRA 50 mM, EDTA 5 mM,  $\text{MgSO}_4$  8 mM, KCl 75 mM, NADH 0,2 mM, PEP 0,8 mM, LDH 25  $\mu$ g, PK 10  $\mu$ g, pH 7,6 ). Das Enzym wurde nur mit G-6-P gemessen.

Die Phosphorylase wurde nach C o r i in einer Modifikation von H e r s bestimmt (24). Das Substrat enthielt G-1-P ( 12,5 mM, 25,0 mM.....75,0 mM ), Glykogen 2%, AMP 0,003 M, NaF 0,2 M, pH 6,1. Das Substrat wurde auch ohne AMP angesetzt. 100  $\mu$ l Homogenisat und 100  $\mu$ l Substrat wurden bei 37°C inkubiert. Nach 20 und 40 Minuten wurde die Reaktion durch 10%ige TCA abgestoppt. Ein Blindwert lief parallel. Der Phosphor wurde nach F i s k e und S u b b a r o w (25) mit einer Test-Kombination von Merck, Darmstadt, bestimmt.

Die Glukose-6-phosphatase wurde nach der Methode von H e r s gemessen (24). Gleichzeitig wurde die Aktivität anderer Phosphatasen, die Inaktivierung bei pH 5,0 und die Inkubation mit  $\beta$ -Glycerophosphat bestimmt. Ein Gemisch von 0,1 ml G-6-P ( 2,5 mM, 5,0 mM... ..25,0 mM ) oder 0,1 ml  $\beta$ -Glycerophosphat 0,1 M ( jedes pH 6,5 ) und 0,1 ml Leberhomogenisat wurden bei 37°C für 60 Minuten inkubiert. Ein anderes Leberhomogenisat von 0,1 ml wurde bei 37°C für 5 Minuten in 0,01 ml Acetatpuffer 0,1 M und einem pH von 5,0 vorinkubiert. Dann wurden 0,1 ml G-6-P hinzugegeben und wie oben gemessen. Nach Abstoppen der Reaktion mit 10%iger TCA wurde der freigesetzte Phosphor bestimmt ( siehe Phosphorylase ). Die Differenz in der Aktivität zwischen den Ergebnissen mit G-6-P und  $\beta$ -Glycerophosphat und den Werten vor und nach Inaktivierung bei pH 5,0 ergibt die spezifische Aktivität der G-6-Pase.

Die  $\alpha$ -Glukosidase wurde nach der Methode von H e r s (26) bestimmt. 100  $\mu$ l Homogenisat wurden mit 100  $\mu$ l Na-Acetatpuffer 50 mM, pH 4,0 und 50  $\mu$ l Maltose ( 0,3 mg/ml, 0,5 mg/ml.....2,0 mg/ml ) bei 37°C für 4 Stunden inkubiert. Ein Blindwert lief parallel. Die Reaktion wurde mit 0,3 M PCA in einer Verdünnung von 1:10 abgestoppt. Die freigewordene Glukose wurde mit HK und G6PDH mit Hilfe einer Testsubstanzen-Kombination von Böhringer Mannheim im UV-Test gemessen.

Die Bestimmung der Amylo-1,6-glukosidase erfolgte wiederum nach H e r s (27). Das Substrat PLD ist Grenz-dextrin, das aus Glykogen unter Einwirkung von Phosphorylase b und Spaltung der 1-6-Bindungen entsteht. Zur Herstellung wurden 16,0 mM AMP, 5  $\mu$ g Phosphorylase b und 0,3 g Glykogen ( Reinheitsgrad II ) in 10 ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer gelöst und gegen denselben Puffer 12 Stunden bei 20°C dialysiert. Jede 4. Stunde wurde der Puffer gewechselt. Das Dialysat wurde mit 0,5 g TCA enteiweißt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde mit soviel Äthanol ausgefällt ( PLD fällt aus ), daß eine 70%ige Alkohollösung entstand. Nach Zentrifugation wurde das Sediment in 1%iger  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Lösung gelöst und mit Alkohol eine 70%ige Lösung hergestellt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Das in Aqua dest. gelöste Sediment wurde nun 6 Stunden gegen Aqua bidest. dialysiert. Danach erfolgte Fällung mit Alkohol. Zentrifugation und Trocknung des Sediments. Das Substrat wurde mit PLD ( 1,25 mg/ml, 2,50 mg/ml... 10,0 mg/ml ), 0,1 M Histidinium-chlorid und 0,005 M EDTA hergestellt ( pH 6,5 ).

0,1 ml Homogenisat und 0,1 ml Substrat wurden 4 Stunden bei 37°C inkubiert. 50  $\mu$ l des Inkubationsgemisches werden nach Enteiweißung mit 450  $\mu$ l PCA zur Leerwertbestimmung benutzt. Anschließend wurden 50  $\mu$ l des Inkubats mit PCA im Verhältnis 1:10 enteiweißt und nach Zentrifugation im Überstand die freigesetzte Glukose gemessen ( siehe  $\alpha$ -Glukosidase ).

Alle Chemikalien, die verwendet wurden, stammten von Böhrlinger & Söhne, Mannheim, und Merck AG, Darmstadt.

Tabelle 1 zeigt die für jedes Enzymassay zur Ermittlung der Michaelis-Konstanten verwendeten Substrate und deren Konzentrationen in mindestens fünf verschiedenen Testansätzen.

| Enzym                 | Substrat | ( C ) | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |
|-----------------------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| G-6-PDH               | G-6-P    | mM    | 0,05  | 0,10  | 0,15  | 0,20  | 0,40  | 0,60  |
| 6-PGDH                | 6-P-G    | mM    | 0,02  | 0,04  | 0,05  | 0,10  | 0,15  | 0,20  |
| PGI                   | F-6-P    | mM    | 0,20  | 0,40  | 0,60  | 0,80  | 1,00  | 1,20  |
| PGM                   | G-1-P    | mM    | 0,10  | 0,20  | 0,40  | 0,60  | 0,80  | 1,00  |
| F-1,6-DPase           | F-1,6-DP | mM    | 0,010 | 0,020 | 0,025 | 0,050 | 0,075 | 0,100 |
| F-6-PK                | F-6-P    | mM    | 0,20  | 0,40  | 0,60  | 0,80  | 1,00  | 1,20  |
| Phosphorylase(opt.)   | Glykogen | mg/ml | 0,10  | 0,20  | 0,30  | 0,40  | 0,50  | 0,60  |
| Glykogensynthetase    | UDPG     | mM    | 1,66  | 3,33  | 5,00  | 6,66  | 8,33  |       |
| Phosphorylase(Hers)   | G-1-P    | mM    | 12,50 | 25,00 | 37,50 | 50,00 | 75,00 |       |
| G-6-Pase              | G-6-P    | mM    | 2,50  | 5,00  | 10,00 | 15,00 | 20,00 | 25,00 |
| $\alpha$ -Glukosidase | Maltose  | mg/ml | 0,30  | 0,50  | 0,60  | 1,00  | 1,60  | 2,00  |
| Amylo-1,6-Glukosidase | PLD      | mg/ml | 1,25  | 2,50  | 3,75  | 5,00  | 7,50  | 10,00 |

# Prinzip und Beispiel aus der Versuchsreihe zur Bestimmung der Michaelis-Konstanten.

Nach der Theorie von Michaelis und Menten ( 8 ) bildet das Enzym mit seinem Substrat einen zwar kurzlebigen, jedoch hoch aktiven Enzymsubstrat-Komplex. In diesem wird das Substrat umgesetzt und als Produkt aus dem Komplex entlassen. Das Enzym steht dann wieder für die Anlagerung eines neuen Substrats und dessen Umsatzes zur Verfügung.

Diese Formulierung läßt sich als Gleichung wie folgt schreiben:



(E = Enzym, S = Substrat, ES = Enzym-Substrat-Komplex, P = Reaktions-  
Produkt)

Wendet man nun das Massenwirkungsgesetz an, so bedeutet das für die Bildung von ES, daß bei gleichbleibender Konzentration von E die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion, die man direkt messen kann, am Anfang proportional der Konzentration von S ist. Erhöht man nach und nach die Substratkonzentration, so wird immer mehr Enzym in den Enzym-Substrat-Komplex übergeführt, d.h. die Reaktionsgeschwindigkeit steigt, bis praktisch alles Enzym im Enzym-Substrat-Komplex vorliegt.

Zu dem tatsächlichen Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit ein Beispiel aus der Versuchsreihe: an einer Rattenleber vom 23. Fötaltag wurde die Aktivität der PGM bei aufsteigenden Substratkonzentrationen gemessen.

Substratkonzentration S(mM)    Reaktionsgeschwindigkeit V(μmol/g/min)

|      |       |
|------|-------|
| 0,10 | 36,36 |
| 0,20 | 46,62 |
| 0,40 | 58,82 |
| 0,60 | 63,36 |
| 0,80 | 65,95 |
| 1,00 | 67,34 |

Zeichnet man diese Werte in einem Diagramm auf, so erhält man eine Kurve, die im Bereich der höheren Substratkonzentrationen wesentlich flacher verläuft als zu den anfänglichen Konzentrationen, d.h. daß das Enzym weitgehend mit Substrat gesättigt und eine Maximalgeschwindigkeit nahezu erreicht ist.

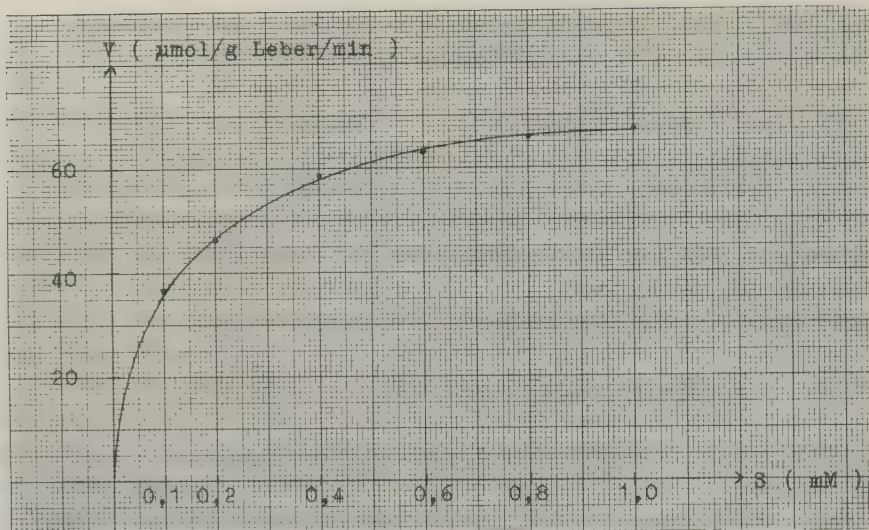


Abb.2: Beziehung zwischen der Substratkonzentration ( G-1-P ) und der Aktivität der PGM,geprüft an einer Rattenleber vom 23.Fötaltag.

Die Sättigungskonzentration läßt sich aus dem Verlauf der oben abgebildeten Hyperbel nur ungenau ablesen. Michaelis und Menten wählten deshalb die halbmaximale Geschwindigkeit als Bezugspunkt. Hier muß dann die Hälfte des vorhandenen Enzyms frei, die andere Hälfte im Enzym-Substrat-Komplex, also als ES vorliegen.

Aus der Gleichung  $E + S \rightleftharpoons ES$  entsteht dann unter Anwendung des Massenwirkungsgesetzes folgende Beziehung:

$$\frac{(E) \times (S)}{(ES)} = K, \text{ wobei } K \text{ die Dissoziationskonstante des}$$

Zwischenproduktes der Reaktion, also des Enzym-Substrat-Komplexes darstellt. Wenn  $E = ES$  sein soll, hängt nach obiger Beziehung die Geschwindigkeit nur noch von der Substratkonzentration ab und es bleibt die einfache Gleichung:

$$(S) = K_m$$

Diese Dissoziationskonstante, die sogenannte  $K_m$ , die nach dem Begründer dieser Theorie "Michaelis-Konstante" genannt wird, entspricht danach der Substratkonzentration, bei der die halbe maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht ist. Die  $K_m$  hat demnach die Dimension einer Substratkonzentration ( Mol/l ). Bei dieser Konzentration, die von Enzym zu Enzym und für ein Enzym von

Substrat zu Substrat verschieden groß ist, ist das Enzym zur Hälfte gesättigt.

1934 fanden L i n e w e a v e r und B u r k ein Verfahren, die Michaelis-Konstante und die Maximalgeschwindigkeit exakt bestimmen zu können, ohne hohe Substratkonzentrationen verwenden zu müssen (6). Durch eine doppelt reziproke Auftragung wandelten sie die Kurve in eine Gerade um. Aus der Gleichung

$$v = \frac{v_{\max} \cdot (S)}{K_m + (S)}$$

erhielt man durch Umformung in ihre reziproke Form eine Geradengleichung der allgemeinen Formulierung  $y = ax + b$ , nämlich

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{(S)} + \frac{1}{v_{\max}}$$

wobei

$$y = \frac{1}{v}, \quad a = \frac{K_m}{v_{\max}}, \quad x = \frac{1}{(S)} \quad \text{und} \quad b = \frac{1}{v_{\max}} \quad \text{entspricht.}$$

Zur ausführlichen Ableitung der Michaelis-Konstanten und des Lineweaver-Burk-Verfahrens wird auf die entsprechende Fachliteratur verwiesen. (5,6,7,8).

Durch Auftragen von  $1/v$  gegen  $1/(S)$  kann man also schon graphisch die Michaelis-Konstante berechnen. Hierzu wieder ein praktisches Beispiel aus der Versuchsreihe mit denselben der Substrat-Aktivitätskurve zur Verfügung stehenden Werten:

| $\frac{1}{(S)}$ | $\frac{1}{v}$ |
|-----------------|---------------|
| 10              | 0,0275        |
| 5               | 0,0214        |
| 2,50            | 0,0170        |
| 1,66            | 0,0157        |
| 1,25            | 0,0151        |
| 1,00            | 0,0148        |

Die x-Achse wird von  $\frac{1}{(S)}$  dargestellt, die y-Achse von  $\frac{1}{v}$ .

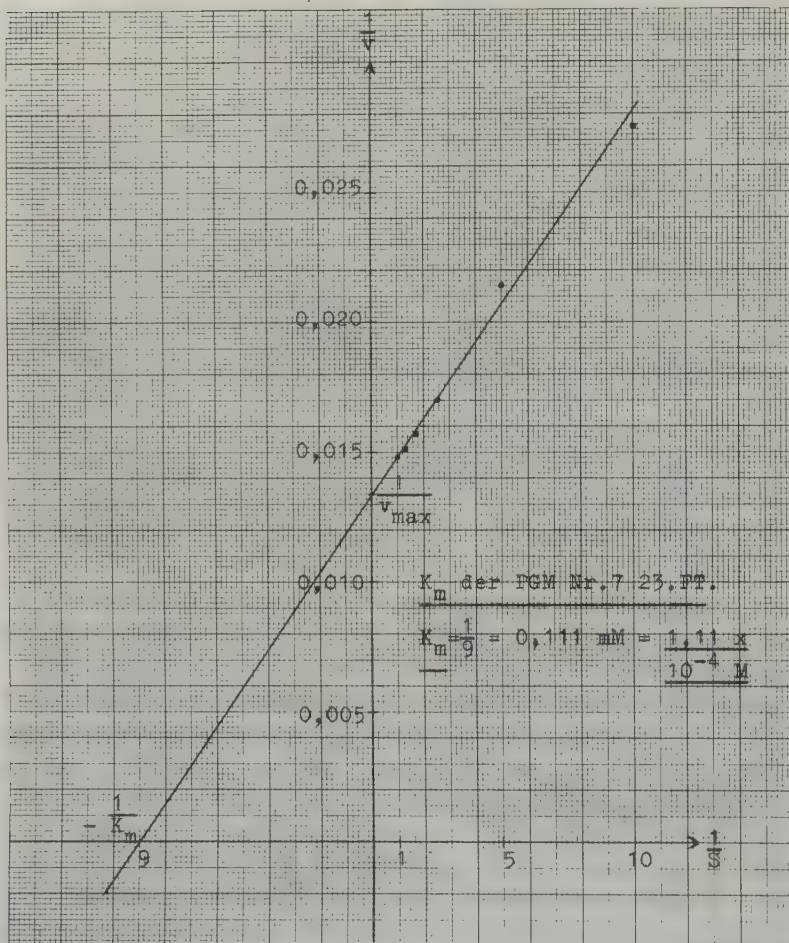


Abb.3: Bestimmung der Michaelis-Konstante der PGM aus einer am 23.Fötaltag entnommenen fötalen Rattenleber mit Hilfe des Lineweaver-Burk-Diagramms. Die auf diese Weise ermittelte Konstante ergibt eine  $K_m$  von  $1,11 \times 10^{-4} \text{ M}$ .

Wie man sieht, weist die Gerade in diesem Diagramm zwei Schnittpunkte auf. Der Schnittpunkt auf der y-Achse gibt für  $x=0$  den reziproken Wert der Maximalgeschwindigkeit an, der Schnittpunkt auf der x-Achse gibt für  $y=0$  den reziproken Wert der Michaelis-Konstanten an.

Man kann also mit Hilfe der Darstellung nach L i n e w e a v e r und B u r k sowohl die Michaelis-Konstante als auch die mögliche Maximalreaktionsgeschwindigkeit ermitteln.

### Statistische Methoden

Durch das Lineweaver-Burk-Verfahren wird die Substrat-Aktivitäts-Kurve in eine Gerade umgewandelt. Eine nur mit Hilfe der Graphik bestimmte Gerade weist nur dann ein signifikantes Ergebnis auf, wenn alle Wertpunkte eine exakt lineare Beziehung erkennen lassen. Liegt nur ein Punkt außerhalb der vermeintlichen Geraden, ist eine präzise Bestimmung des Verlaufes unter Berücksichtigung einer Signifikanzschranke ausschließlich mit mathematischen bzw. statistischen Methoden möglich.

Deshalb wurden, um die Gerade und deren Schnittpunkte auf der x- und y-Achse einwandfrei und statistisch gesichert ermitteln zu können, bei jeder Bestimmung eines  $K_m$ -Wertes der Korrelationskoeffizient  $r$  sowie die Regressionskoeffizienten  $a$  und  $b$  der linearen Regressionsfunktion  $y = a + bx$  aus  $n$  Wertepaaren  $(x_i, y_i, i = 1, 2, \dots, n)$  berechnet. Anschließend erfolgte die Prüfung des Korrelationskoeffizienten  $r$ . Er ist ein Maß für die stochastische Abhängigkeit der beiden Variablen  $x$  und  $y$ . Sein Wert kann zwischen  $-1$  und  $+1$  variieren. Beträgt er  $-1$  oder  $+1$ , so sind die beiden Veränderlichen total voneinander abhängig. Ist sein Wert  $0$ , so sind die beiden Variablen voneinander völlig unabhängig, d.h. sie korrelieren nicht.

Als Signifikanzschranke wurde eine zweiseitige Irrtumswahrscheinlichkeit  $2\alpha = \text{kleiner } 0,01$  gefordert. In einigen Fällen wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $2\alpha = \text{kleiner } 0,05$  in Kauf genommen, um eine ausreichende Anzahl vergleichbarer Ergebnisse zu erhalten. In den meisten Fällen wurde jedoch eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $2\alpha = \text{kleiner } 0,001$  erreicht.

Auch hierzu wieder das Beispiel aus der Versuchsreihe zur vorhin mittels Graphik bestimmten Geraden. Es erfolgt die Prüfung der ermittelten Wertpaare auf Korrelation, lineare Regression und Signifikanz mit Hilfe einer derartig programmierten Rechenmaschine:

|           |        |
|-----------|--------|
| 10,000000 | x-Wert |
| 0,027500  | y- "   |
| 5,000000  | x- "   |
| 0,021400  | y- "   |
| 2,500000  | x- "   |
| 0,017000  | y- "   |
| 1,666600  | x- "   |
| 0,015700  | y- "   |
| 1,250000  | x- "   |
| 0,015100  | y- "   |
| 1,000000  | x- "   |
| 0,014800  | y- "   |
| 0,999965  | r      |
| 0,001435  | b      |
| 0,013461  | a      |

Aus dieser Berechnung erhält man als Ergebnis drei Zahlen, die den Korrelationskoeffizienten  $r$  und die Regressionskoeffizienten  $a$  und  $b$  zu den eingetippten  $x$ - und  $y$ -Werten darstellen. Dabei ist  $a$  das Interzept auf der  $y$ -Achse,  $b$  der Tangens des Steigungswinkels  $\beta$ , d.h. das Steigungsmaß der Geraden. Das gesuchte  $x$  ergibt sich aus der allgemeinen Steigungsgleichung  $y = a + bx$ , wobei  $x = \frac{y-a}{b}$ ,  $\bar{x} = \frac{1}{\bar{S}} = -\frac{1}{K_m}$ .

In oben aufgeführtes Beispiel eingesetzt ergibt dies:

$$-\frac{a}{b} = -\frac{0,013461}{0,001435} = -9,38. \quad \underline{\underline{K_m}} = \frac{1}{9,38} = 0,106 \text{ mM} = \underline{\underline{1,06 \times 10^{-4} \text{ M}}}.$$

Das Ergebnis des Korrelationskoeffizienten  $r$  weist bei  $n = 6$  Wertpaaren eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $2\alpha = \text{kleiner } 0,001$  aus.

Diese also statistisch gesicherte  $K_m$  der PGM einer Rattenleber vom 23. Fötaltag zeigt in diesem Beispiel im Vergleich mit der allein graphisch ermittelten  $K_m$  von  $1,11 \times 10^{-4} \text{ M}$  nur eine belanglose Diskrepanz.

Auf die eben veranschaulichte Art und Weise wurden 450 Michaelis-Konstanten ermittelt, die statistisch gesichert sind.

E R G E B N I S S E

|            |                                        |
|------------|----------------------------------------|
| I. G-6-PDH | $K_m = \dots \times 10^{-5} \text{ M}$ |
|------------|----------------------------------------|

| 15.u.16.FT     | 22.u.23.FT | 1.LT   | 20.LT  |
|----------------|------------|--------|--------|
| 0,80 a         | 2,32 b     | 2,67 a | 1,59 a |
| 1,57 b         | 2,57 a     | 2,91 a | 2,15 b |
| 2,09 b         | 2,62 a     | 2,91 b | 2,40 b |
| 2,81 a         | 2,67 b     | 3,05 a | 2,52 b |
| 3,09 a         | 2,96 a     | 3,49 a | 3,05 b |
| 3,42 a         | 3,18 b     | 3,54 c | 3,20 a |
| 3,71 b         | 3,31 a     | 3,88 b | 3,39 b |
| 3,77 a         | 3,33 a     | 4,61 a | 3,69 b |
| 3,78 b         | 3,43 a     |        |        |
| 4,08 b         | 3,74 a     |        |        |
| 4,37 b         | 4,23 a     |        |        |
| 4,71 b         | 4,79 a     |        |        |
| 5,83 b         | 5,92 a     |        |        |
|                | 8,77 a     |        |        |
| $\bar{x}$ 3,38 | 3,84       | 3,38   | 2,74   |
| n 13           | 14         | 8      | 8      |

Tabelle 2: 43 aus Lebergewebe von fötalen und neonatalen Ratten bestimmte Michaelis-Konstanten der G-6-PDH zu vier verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung. Die 1.Gruppe umfaßt Ratten vom 15.u.16.Fötaltag, die 2.Gruppe vom 22.u.23.Fötaltag, die 3.Gruppe wird von Ratten des 1.Lebenstages und die 4.Gruppe von Ratten des 20.Lebenstages gebildet. Die Meßwerte wurden innerhalb der Gruppen der Größe nach geordnet, um einen Überblick über die Schwankungsbreite und die Verteilung der einzelnen Ergebnisse zu bekommen. Die hinter jedem Wert befindlichen Buchstaben a, b und c stellen die Irrtumswahrscheinlichkeit  $2\alpha$  dar, die sich auf die Regressions-Gerade bezieht, wie unter den statistischen Methoden bereits veranschaulicht. Dabei ist  $a: 2\alpha < 0,001$ ,  $b: 2\alpha < 0,01$  und  $c: 2\alpha < 0,05$ .  $\bar{x}$  stellt den arithmetischen Mittelwert und n die Anzahl der untersuchten Leberextrakte dar.

Wie man aus der Tabelle ersehen kann, bleiben die Mittelwerte der G-6-PDH in allen vier Gruppen "konstant".

II. 6-P-GDH

$$K_m = \dots \times 10^{-5} \text{ M}$$

| 15.u.16.FT |      | 22.u.23.FT |   | 1.LT |   | 20.LT |   |
|------------|------|------------|---|------|---|-------|---|
| 1,14       | a    | 0,68       | a | 0,64 | a | 1,72  | c |
| 1,67       | a    | 0,76       | b | 0,71 | c | 3,28  | b |
| 1,90       | c    | 0,92       | a | 0,74 | a | 3,40  | a |
| 2,13       | a    | 0,97       | c | 0,88 | b | 4,12  | b |
| 3,10       | a    | 1,03       | b | 0,92 | c |       |   |
|            |      | 1,20       | a | 1,08 | b |       |   |
|            |      | 1,75       | a | 1,24 | a |       |   |
|            |      | 2,09       | a | 1,43 | a |       |   |
|            |      |            |   | 1,61 | a |       |   |
| $\bar{x}$  | 1,98 | 1,17       |   | 1,02 |   | 3,13  |   |
| n          | 5    | 8          |   | 9    |   | 4     |   |

Tabelle 3: 26 Bestimmungen der Michaelis-Konstante der 6-P-GDH in vier verschiedenen Altersgruppen. Erklärung siehe Tabelle 2!

a:  $2\alpha < 0,001$

b:  $2\alpha < 0,01$

c:  $2\alpha < 0,05$

Die Ergebnisse bei der 6-Phosphogluconatdehydrogenase zeigen vom 15.Fötaltag bis zum 1.Lebenstag eine Verminderung des  $K_m$ -Mittelwertes auf die Hälfte des Ausgangswertes. Am 20.Lebenstag erreicht die Michaelis-Konstante einen dreimal höheren Wert als am 1.Lebenstag. Es ist zu berücksichtigen, daß wegen der geforderten Irrtumswahrscheinlichkeit in der ersten Gruppe nur fünf und in der letzten Gruppe nur vier  $K_m$ -Werte zum Vergleich zur Verfügung standen.

|          |                                        |
|----------|----------------------------------------|
| III. PGI | $K_m = \dots \times 10^{-4} \text{ M}$ |
|----------|----------------------------------------|

| 15.u.16.FT     | 22.u.23.FT | 1.LT   | 20.LT  |
|----------------|------------|--------|--------|
| 0,72 a         | 0,61 b     | 0,60 b | 0,59 b |
| 0,90 b         | 0,66 a     | 0,96 a | 0,75 b |
| 0,97 b         | 1,07 b     | 1,06 a | 0,90 a |
| 1,30 c         | 1,13 b     | 1,06 b | 0,93 b |
| 1,36 a         | 1,16 b     | 1,37 b | 0,98 a |
| 1,60 b         | 1,27 c     | 1,50 a | 1,02 b |
| 1,68 b         | 1,27 c     | 2,13 a | 1,09 a |
| 1,86 a         | 1,53 b     | 2,27 b | 1,17 a |
| 1,98 b         | 1,81 b     | 2,73 b | 1,30 a |
| 4,25 a         | 2,23 b     |        | 1,52 b |
| 4,29 b         | 2,84 b     |        |        |
| 4,65 a         | 3,11 a     |        |        |
|                | 3,58 a     |        |        |
|                | 4,48 b     |        |        |
| $\bar{x}$ 2,13 | 1,91       | 1,52   | 1,02   |
| n 12           | 14         | 9      | 10     |

Tabelle 4: 45 Meßwerte für die Michaelis-Konstante der Phosphoglukoisomerase, bestimmt aus der Leber fötaler und neugeborener Ratten. Erklärung zur Tabelle siehe Tabelle 2!

a:  $2\alpha \leq 0,001$

b:  $2\alpha \leq 0,01$

c:  $2\alpha \leq 0,05$

Der Mittelwert für die Michaelis-Konstante der PGI fällt vom 15.Fötaltag bis zum 20.Lebenstag kontinuierlich auf die Hälfte des Ausgangswertes ab.

|         |                                        |
|---------|----------------------------------------|
| IV. PGM | $K_m = \dots \times 10^{-4} \text{ M}$ |
|---------|----------------------------------------|

| 15.u.16.FT     | 22.u.23.FT | 1.LT   | 20.LT  |
|----------------|------------|--------|--------|
| 0,25 b         | 0,44 a     | 0,95 a | 0,95 a |
| 0,67 a         | 0,61 a     | 1,01 a | 1,02 a |
| 0,86 b         | 0,70 a     | 1,19 a | 1,12 a |
| 0,87 b         | 1,05 b     | 1,34 b | 1,14 a |
| 0,94 b         | 1,06 a     | 1,36 a | 1,16 a |
| 0,96 a         | 1,08 a     | 1,40 a | 1,22 a |
| 0,98 a         | 1,08 a     | 1,42 a | 1,26 a |
| 1,04 a         | 1,10 a     | 1,52 a | 1,38 b |
| 1,14 b         | 1,15 b     | 1,64 a | 1,42 a |
| 1,21 a         | 1,17 a     | 2,04 b | 1,44 a |
| 1,21 a         | 1,18 a     |        |        |
| 1,76 a         | 1,22 b     |        |        |
|                | 1,29 a     |        |        |
|                | 1,40 a     |        |        |
|                | 2,34 a     |        |        |
| $\bar{x}$ 0,99 | 1,12       | 1,38   | 1,21   |
| n 12           | 15         | 10     | 10     |

Tabelle 5: 47  $K_m$ -Werte der Phosphoglukomutase aus der Leber pränataler und postnataler Ratten. Weitere Erklärung zur Tabelle siehe Tabelle 2!

a:  $2\alpha < 0,001$

b:  $2\alpha < 0,01$

c:  $2\alpha < 0,05$

Die Mittelwerte der postnatalen Michaelis-Konstante für die Phosphoglukomutase liegen gegenüber der pränatalen  $K_m$  geringgradig höher. Der niedrigste Mittelwert wird am 15. bzw. 16. Fötaltag gefunden, der höchste am 1. Lebenstag.

|                |                                        |
|----------------|----------------------------------------|
| V. F-1,6-DPase | $K_m = \dots \times 10^{-5} \text{ M}$ |
|----------------|----------------------------------------|

| 15.u.16.FT    | 22.u.23.FT | 1.LT   | 20.LT  |
|---------------|------------|--------|--------|
|               | 0,44 a     | 0,66 b | 0,44 b |
|               | 0,61 a     | 0,79 b | 0,57 a |
|               | 1,00 a     | 1,46 b | 0,82 b |
|               | 1,00 b     | 2,15 b | 1,46 b |
|               | 1,11 a     | 2,20 a | 1,88 a |
|               | 1,13 b     | 2,32 a | 2,31 a |
|               | 1,51 a     | 2,32 a | 2,47 a |
|               | 1,55 b     | 2,38 a | 2,71 a |
|               | 1,67 a     | 2,70 a | 2,87 a |
|               | 1,75 a     | 5,93 a | 4,07 a |
|               | 2,05 a     |        |        |
|               | 2,26 a     |        |        |
|               | 2,38 a     |        |        |
|               | 2,52 a     |        |        |
| $\bar{x}$ --- | 1,49       | 2,29   | 1,96   |
| n ---         | 14         | 10     | 10     |

Tabelle 6: 34 vom 22.Fötaltag bis 20.Lebenstag an Ratten gemessene Michaelis-Konstanten des Leberenzym F-1,6-DPase.Ausführliche Erklärung zur Tabelle siehe Tabelle 2!

a:  $2\alpha < 0,001$

b:  $2\alpha < 0,01$

c:  $2\alpha < 0,05$

Die Untersuchungen mit der Fruktose-1,6-diphosphatase ergaben erst am 22.Fötaltag gut meßbare Werte.Wie Tabelle 6 zeigt,ist der Mittelwert der Michaelis-Konstante bei den Föten am kleinsten. Die Werte vom 1. und 20.Lebenstag unterscheiden sich nicht und liegen um etwa ein Viertel höher als am 22.bzw.23.Fötaltag.

|            |                                        |
|------------|----------------------------------------|
| VI. F-6-PK | $K_m = \dots \times 10^{-4} \text{ M}$ |
|------------|----------------------------------------|

| 15.u.16.FT     | 22.u.23.FT | 1.LT   | 20.LT  |
|----------------|------------|--------|--------|
| 1,02 b         | 0,85 a     | 1,10 b | 0,97 b |
| 1,14 a         | 0,94 a     | 1,29 a | 0,99 b |
| 1,18 a         | 0,96 a     | 1,61 a | 1,03 b |
| 1,27 a         | 1,16 a     | 1,88 a | 1,05 b |
| 1,43 a         | 1,40 a     | 2,04 a | 1,06 b |
| 1,46 b         | 1,42 b     | 2,12 a | 1,10 b |
| 1,50 a         | 1,49 a     | 2,14 a | 1,60 b |
| 1,65 a         | 1,54 a     | 2,15 a |        |
| 1,77 a         | 1,68 a     | 2,39 b |        |
| 2,00 b         | 1,93 b     |        |        |
| 2,94 b         | 2,14 b     |        |        |
| 8,84 a         | 2,25 b     |        |        |
|                | 2,32 b     |        |        |
|                | 3,06 a     |        |        |
|                | 3,35 a     |        |        |
| $\bar{x}$ 2,18 | 1,76       | 1,85   | 1,11   |
| n 12           | 15         | 9      | 7      |

Tabelle 7: 43 Michaelis-Konstanten der F-6-PK, gemessen in der Leber fötaler und neugeborener Ratten.

Erklärung siehe auch Tabelle 2!

a:  $2\alpha < 0,001$

b:  $2\alpha < 0,01$

c:  $2\alpha < 0,05$

Beim Vergleich der Einzel- und Mittelwerte der Michaelis-Konstante für die Fruktose-6-phosphokinase aus den vier Altersgruppen fällt auf, daß die fötalen und kurz nach der Geburt ermittelten  $K_m$ -Werte fast doppelt so hoch sind wie die älteren.

VII. Phosphorylase ( G-1-P-Freisetzung )  $K_m = \dots \text{ mg/ml}$

| 15.u.16.FT      | 22.u.23.FT | 1.LT    | 20.LT   |
|-----------------|------------|---------|---------|
| 0,029 c         | 0,041 b    | 0,026 c | 0,033 c |
| 0,033 b         | 0,047 c    | 0,031 c | 0,053 b |
| 0,043 b         | 0,049 a    | 0,062 c | 0,059 c |
| 0,051 b         | 0,114 b    | 0,065 a | 0,079 b |
| 0,110 a         | 0,292 c    | 0,084 c | 0,090 b |
| 0,172 a         |            | 0,097 b |         |
| 0,192 b         |            | 0,112 b |         |
| $\bar{x}$ 0,090 | 0,108      | 0,068   | 0,062   |
| n 7             | 5          | 7       | 5       |

Tabelle 8: 24 Einzelergebnisse aus den Experimenten mit fötalen und neugeborenen Rattenlebern zur Ermittlung der Michaelis-Konstante der Phosphorylase im optischen Test. Wegen des nicht genau festsetzbaren Molekulargewichtes des Glykogens wird die Dimension der  $K_m$  in mg/ml angegeben. Siehe auch Tabelle 2!

a:  $2\alpha < 0,001$

b:  $2\alpha < 0,01$

c:  $2\alpha < 0,05$

Die in der Fötalzeit gemessenen Mittelwerte für die Michaelis-Konstante der optisch bestimmten Phosphorylase liegen etwa um ein Drittel höher als in der postnatalen Periode. Beim Vergleich der Einzelwerte ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zu erkennen.

VIII. Phosphorylase (P-Freisetzung mit AMP)  $K_M = \dots \times 10^{-2} M$

| 15.u.16.FT     | 22.u.23.FT | 1.LT   | 20.LT  |
|----------------|------------|--------|--------|
| 0,59 b         | 0,68 a     | 0,66 b | 1,09 b |
| 0,64 a         | 0,97 b     | 0,92 b | 1,10 b |
| 0,68 b         | 1,14 b     | 0,94 b | 1,17 a |
| 0,77 b         | 1,22 b     | 1,07 b | 1,22 c |
| 1,14 a         | 1,43 b     | 1,14 b | 1,96 a |
| 1,47 a         | 1,62 b     | 1,16 b | 2,08 b |
| 1,51 b         | 1,67 a     | 1,21 b | 2,28 a |
| 2,25 b         | 1,72 a     | 1,61 b |        |
|                | 2,49 a     | 1,70 a |        |
|                | 3,37 a     | 3,55 b |        |
| $\bar{x}$ 1,13 | 1,63       | 1,40   | 1,56   |
| n 8            | 10         | 10     | 7      |

Tabelle 9: 35 Michaelis-Konstanten der nach der Methode von Hers untersuchten Phosphorylase ( Phosphat-freisetzung mit AMP ) in der Leber fötaler und neugeborener Ratten.

a:  $2\alpha < 0,001$

b:  $2\alpha < 0,01$

c:  $2\alpha < 0,05$

Erklärung siehe Tabelle 2!

Die Mittelwerte der Michaelis-Konstante für die Phosphorylase ( Phosphat-freisetzung mit AMP ) sind kurz vor dem Geburtstermin, nach der Geburt und auch später gleich groß. Demgegenüber liegt der Mittelwert aus der 1. Gruppe, also am 15. bzw. 16. Fötaltag um circa 30% niedriger.

IX. Phosphorylase (P-Freisetzung ohne AMP)  $K_m = \dots \times 10^{-2} M$

| 15.u.16.FT |      | 22.u.23.FT |   | 1.LT | 20.LT |
|------------|------|------------|---|------|-------|
| 0,24       | b    | 0,85       | b | 0,57 | a     |
| 0,51       | b    | 0,88       | a | 0,68 | b     |
| 0,57       | b    | 1,91       | b | 0,75 | a     |
| 0,57       | b    | 2,85       | b | 0,86 | b     |
| 0,60       | b    | 4,29       | a | 0,87 | a     |
| 0,64       | b    | 5,88       | b | 1,19 | b     |
| 0,84       | a    | 7,46       | b | 1,61 | b     |
| 2,13       | b    | 8,40       | b | 2,79 | b     |
|            |      | 17,85      | a |      | a     |
|            |      |            |   |      |       |
| $\bar{x}$  | 0,76 | 5,60       |   | 1,17 | 2,24  |
| n          | 8    | 9          |   | 8    | 10    |

Tabelle 10: 35 Michaelis-Konstanten der nach der Methode von Hers untersuchten Phosphorylase ( Phosphat-freisetzung ohne AMP ) in der Leber fötaler und postnataler Ratten.

a:  $2\alpha < 0,001$

b:  $2\alpha < 0,01$

c:  $2\alpha < 0,05$

Erklärung siehe Tabelle 2!

Die Michaelis-Konstante der Phosphorylase ( Phosphat-freisetzung ohne AMP ) weist kurz vor der Geburt, also am 22. und 23. Fötaltag, den größten Mittelwert auf, der um ein Vielfaches höher ist als in den anderen drei Altersgruppen. Der niedrigste Mittelwert erscheint am 15. bzw. 16. Fötaltag, während die Konstanten vom 1. und 20. Lebenstag etwa um das Ein- bis Dreifache höher liegen. Hierzu muß bemerkt werden, daß die Einzelwerte besonders in der 2. Gruppe eine große Schwankungsbreite aufweisen, obwohl die geforderte Irrtumswahrscheinlichkeit immer eingehalten wurde.

X. Gesamtglykogensynthetase

$$K_m = \dots \times 10^{-3} \text{ M}$$

| 15.u.16.FT |      | 22.u.23.FT |   | 1.LT  |   | 20.LT |   |
|------------|------|------------|---|-------|---|-------|---|
| 1,05       | c    | 3,78       | a | 4,65  | b | 0,96  | b |
| 1,37       | b    | 3,78       | a | 5,91  | b | 1,86  | c |
| 2,49       | b    | 4,23       | b | 10,00 | b | 2,28  | b |
| 2,54       | c    | 4,25       | b | 10,09 | b | 2,48  | c |
| 2,93       | a    | 4,32       | b | 10,46 | b | 3,73  | b |
| 4,97       | a    | 4,36       | b | 11,36 | a | 5,02  | b |
| 5,81       | b    | 4,95       | b | 14,61 | b | 5,68  | a |
| 6,21       | a    | 4,95       | b | 34,60 | a | 13,22 | b |
| 6,41       | b    | 6,25       | b | 79,36 | b | 13,98 | a |
| 6,41       | b    | 8,00       | b |       |   |       |   |
|            |      | 9,34       | b |       |   |       |   |
| $\bar{x}$  | 4,02 | 5,29       |   | 20,05 |   | 5,47  |   |
| n          | 10   | 11         |   | 9     |   | 9     |   |

Tabelle 11: 39 Einzelbestimmungen der Michaelis-Konstante für die Gesamtglykogensynthetase ( mit G-6-P ) in der Leber prä- und postnataler Ratten.

a:  $2\alpha < 0,001$

b:  $2\alpha < 0,01$

c:  $2\alpha < 0,05$

Erklärung siehe Tabelle 2!

Bei der Ermittlung der  $K_m$ -Werte der Gesamtglykogensynthetase ( mit G-6-P ) fand sich am 1.Lebenstag ein fünfmal höherer Mittelwert als am 15. und 16.Fötaltag bzw. ein viermal höherer als zu den übrigen Zeitpunkten vor. Wie man aus der Tabelle ersehen kann, schwanken die Werte innerhalb der Gruppen beträchtlich, stimmen aber tendentiell überein. Am 20.Lebenstag erreicht die aus den Einzelwerten gemittelte Michaelis-Konstante wieder die fötalen Werte.

|              |                                        |
|--------------|----------------------------------------|
| XI. G-6-Pase | $K_m = \dots \times 10^{-2} \text{ M}$ |
|--------------|----------------------------------------|

| 15.u.16.FT    | 22.u.23.FT | 1.LT   | 20.LT  |
|---------------|------------|--------|--------|
|               | 1,02 b     | 0,93 b | 1,00 a |
|               | 1,19 a     | 0,99 b | 1,63 a |
|               | 1,78 a     | 1,66 b | 1,72 b |
|               | 2,00 a     | 2,13 b | 1,99 a |
|               | 2,46 a     | 2,30 a | 3,21 a |
|               | 2,92 b     | 2,64 b | 3,24 a |
|               | 5,37 a     | 5,12 b | 3,30 a |
|               | 6,13 b     | 8,47 b | 5,88 a |
| $\bar{x}$ --- | 2,86       | 3,03   | 2,74   |
| n ---         | 8          | 8      | 8      |

Tabelle 12: 24 Bestimmungen der Michaelis-Kostante der Glukose-6-phosphatase bei Rattenlebern vom 22.Fötaltag bis 20.Lebenstag.

a:  $2\alpha < 0,001$

b:  $2\alpha < 0,01$

c:  $2\alpha < 0,05$

Erklärung siehe Tabelle 2!

Die Glukose-6-phosphatase weist erst am 22.Fötaltag brauchbare Meßwerte auf. Die Mittelwerte der Michaelis-Konstanten zeigen in den einzelnen Altersgruppen keine Veränderungen.

|                            |                             |
|----------------------------|-----------------------------|
| XII. $\alpha$ -Glukosidase | $K_m = \dots \text{ mg/ml}$ |
|----------------------------|-----------------------------|

| 15.u.16.FT    | 22.u.23.FT | 1.LT   | 20.LT  |
|---------------|------------|--------|--------|
|               | 0,42 b     | 0,44 a | 0,31 a |
|               | 0,45 b     | 0,59 b | 0,31 b |
|               | 0,51 a     | 0,61 a | 0,34 a |
|               | 0,51 a     | 0,61 b | 0,36 a |
|               | 0,54 b     | 0,68 a | 0,46 a |
|               | 0,79 a     | 0,75 a | 0,52 a |
|               | 0,84 a     | 0,90 a | 0,57 b |
|               | 0,87 a     | 0,95 b | 0,75 a |
|               | 0,95 a     | 0,99 b | 0,90 a |
|               | 1,10 a     | 1,29 a | 1,13 a |
| $\bar{x}$ --- | 0,70       | 0,78   | 0,57   |
| n ---         | 10         | 10     | 10     |

Tabelle 13: 30  $K_m$ -Werte der in der Leber von fötalen und neugeborenen Ratten untersuchten  $\alpha$ -Glukosidase.

a:  $2\alpha < 0,001$

b:  $2\alpha < 0,01$

c:  $2\alpha < 0,05$

Das lysosomale glykogenspaltende Enzym  $\alpha$ -Glukosidase ließ erst am 22.Fötaltag verwertbare Aktivitäten erkennen. Es ergaben sich praktisch keine Unterschiede. Mittelwert aller 30 gemessenen  $K_m$ -Werte: 0,68 mg/ml.

|                             |                             |
|-----------------------------|-----------------------------|
| XIII. Amylo-1,6-Glukosidase | $K_m = \dots \text{ mg/ml}$ |
|-----------------------------|-----------------------------|

| 15.u.16.FT    | 22.u.23.FT | 1.LT   | 20.LT  |
|---------------|------------|--------|--------|
|               | 0,69 b     | 0,63 b | 0,42 b |
|               | 0,87 a     | 0,79 a | 0,54 b |
|               | 0,88 b     | 0,87 a | 0,56 b |
|               | 0,90 b     | 1,16 a | 0,63 a |
|               | 1,08 a     | 1,17 a | 0,64 b |
|               | 1,20 a     | 1,40 b | 0,86 b |
|               | 1,31 b     | 1,69 a | 1,02 a |
|               | 1,40 a     | 1,78 b |        |
|               | 1,40 b     | 2,32 b |        |
|               | 1,75 a     |        |        |
| $\bar{x}$ --- | 1,15       | 1,31   | 0,67   |
| n ---         | 10         | 9      | 7      |

Tabelle 14: 26 Michaelis-Konstanten der Amylo-1,6-Glukosidase in der Leber fötaler und neugeborener Ratten.

a:  $2\alpha < 0,001$

b:  $2\alpha < 0,01$

c:  $2\alpha < 0,05$

Erklärung siehe Tabelle 2!

Auch bei den Untersuchungen mit der Amylo-1,6-Glukosidase stellten sich erst am 22.Fötaltag verwertbare Aktivitäten ein.Es fällt auf,daß der Mittelwert der Michaelis-Konstante am 20.Lebenstag nur halb so hoch wie kurz vor und nach der Geburt ist.

## D I S K U S S I O N

W a l k e r hat 1962 zum ersten Mal in Untersuchungen über die ontogenetische Entwicklung eines Enzyms, nämlich der Hexokinase, pränatal und postnatal signifikant voneinander unterschiedliche Michaelis-Konstanten in der Leber von Meerschweinchen festgestellt. In der fötalen Leber registrierte er eine  $K_m$  für Glukose von ungefähr  $3 \times 10^{-5}$  M, während er in der adulten Leber mit Hilfe der Michaelis-Konstante zwei Enzyme, die die Phosphorylierung der Glukose katalysieren, nachweisen konnte. Dabei wies das eine Enzym eine ähnliche Michaelis-Konstante wie in der fötalen Leber auf, womit es sich um die schon in der fötalen Leber nachgewiesene Hexokinase handeln mußte. Für das andere Enzym wurde eine  $K_m$  für Glukose von circa  $3 - 4 \times 10^{-3}$  M gemessen. (16). Dieses sogenannte Isoenzym, welches nur in der Leber von adulten Tieren vorkommt, nannte man wegen der Spezifität für Glukose Glukokinase. W a l k e r konnte in weiteren Experimenten einen enzymatischen Aktivierungsprozeß ausschließen, sodaß er daraufhin den naheliegenden Schluß zog, die Glukokinaseentwicklung repräsentiere die Synthese eines neuen Proteins. (18, 19).

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb an Experimenten mit fötalen, neonatalen und adulten Ratten die Frage untersucht, ob auch andere Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels pränatal und postnatal verschiedene Michaelis-Konstanten aufweisen. Da S c h m i d t und S c h m i d t in ihrer Arbeit über optimale Reaktionsbedingungen für Enzym-Aktivitätsbestimmungen auf die Wichtigkeit der richtigen Substratkonzentrationen hinwiesen (13) und U. S t a v e die Bedeutung geeigneter Substratkonzentrationen für Enzymbestimmungen in sich noch entwickelnden Geweben hervorhob (15), wurde dieses Problem an Hand der ermittelten Ergebnisse (Aktivitätsmessungen und  $K_m$ -Bestimmungen) sozusagen retrograd berücksichtigt und überprüft. Dabei konnten mit Hilfe der Michaelis-Konstanten auf einfache Weise die optimalen Substratkonzentrationen für die verschiedenen Enzymassays in allen Altersgruppen ermittelt werden.

Tabelle 15: Sie veranschaulicht die Prüfung der für die Leber von adulten Ratten zusammengestellten Enzymassays auf ihre Brauchbarkeit auch für fötales Rattenlebergewebe. An Hand von Rattenlebern des 22. und 23. Fötaltages wurden die durch höchste Substratkonzentrationen, welche auch für die adulten Lebern herangezogen wurden, erreichten Aktivitäten mit der theoretisch zu erreichenden Maximalgeschwindigkeit verglichen.

| Enzym           | (S) <sub>max</sub> | $\bar{v}$ (μmol/g/min) | $\bar{v}_{max}$ | $\frac{\bar{v}}{\bar{v}_{max}}$ (%) | (S) <sub>max</sub> bei<br>S c h a u b |
|-----------------|--------------------|------------------------|-----------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| PGM             | 1,0 mM             | 69,43                  | 67,11           | 100                                 | 2,0 mM                                |
| G-6-PDH         | 0,6 mM             | 2,61                   | 2,71            | 96,3                                | 2,0 mM                                |
| 6-P-GDH         | 0,2 mM             | 3,16                   | 3,33            | 94,8                                | 0,6 mM                                |
| PGI             | 1,2 mM             | 61,24                  | 65,35           | 93,7                                | 2,0 mM                                |
| Amylo-1,6-Gl.   | 10,0 mg/ml         | 0,86                   | 0,92            | 93,2                                | -----                                 |
| Phosphoryl.a    | 75,0 mM            | 19,09                  | 20,53           | 92,9                                | 100,0 mM                              |
| F-6-PK          | 1,2 mM             | 2,72                   | 3,01            | 90,3                                | 2,0 mM                                |
| F-1,6-DPase     | 0,1 mM             | 2,99                   | 3,38            | 88,4                                | 1,0 mM                                |
| Phosphoryl.opt. | 0,6 mg/ml          | 0,68                   | 0,77            | 88,3                                | 1,0 mg/ml                             |
| α-Glukosidase   | 2,0 mg/ml          | 0,30                   | 0,38            | 79,7                                | 10,0 mg/ml                            |
| Phosphoryl.b    | 75,0 mM            | 10,73                  | 17,00           | 63,1                                | 100,0 mM                              |
| Glyk.synth.ase  | 8,3 mM             | 4,02                   | 6,62            | 60,7                                | 9,5 mM                                |
| G-6-Pase        | 25,0 mM            | 5,17                   | 9,80            | 52,7                                | 100,0 mM                              |

Die angegebenen Aktivitäten sind in Rattenlebergewebe vom 22. und 23. Fötaltag gemessen worden.

$\bar{v}$ : Mittelwert aller gemessenen  $v$

$\bar{v}_{max}$ : Mittelwert aller errechneten, theoretischen  $v_{max}$

(S)<sub>max</sub>: Höchste verwendete Substratkonzentration

Wie Tabelle 15 zeigt, war das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeit bei der größten im Test verwendeten Substratkonzentration zu der rein theoretisch zu erreichenden Maximalgeschwindigkeit befriedigend, denn in den meisten Fällen wurden annähernd 90 Prozent der theoretisch möglichen Maximalgeschwindigkeit erreicht, was für die meisten praktischen Untersuchungen ausreicht (7). Da sich zur Bestimmung der Michaelis-Konstante vor allem niedrige Substratkonzentrationen eignen, blieb man in den übrigen Fällen, die aber immer noch über 50 Prozent lagen, bei denselben Substratkonzentra-

## D I S K U S S I O N

W a l k e r hat 1962 zum ersten Mal in Untersuchungen über die ontogenetische Entwicklung eines Enzyms, nämlich der Hexokinase, pränatal und postnatal signifikant voneinander unterschiedliche Michaelis-Konstanten in der Leber von Meerschweinchen festgestellt. In der fötalen Leber registrierte er eine  $K_m$  für Glukose von ungefähr  $3 \times 10^{-5}$  M, während er in der adulten Leber mit Hilfe der Michaelis-Konstante zwei Enzyme, die die Phosphorylierung der Glukose katalysieren, nachweisen konnte. Dabei wies das eine Enzym eine ähnliche Michaelis-Konstante wie in der fötalen Leber auf, womit es sich um die schon in der fötalen Leber nachgewiesene Hexokinase handeln mußte. Für das andere Enzym wurde eine  $K_m$  für Glukose von circa  $3 - 4 \times 10^{-3}$  M gemessen. (16). Dieses sogenannte Isoenzym, welches nur in der Leber von adulten Tieren vorkommt, nannte man wegen der Spezifität für Glukose Glukokinase. W a l k e r konnte in weiteren Experimenten einen enzymatischen Aktivierungsprozeß ausschließen, sodaß er daraufhin den naheliegenden Schluß zog, die Glukokinaseentwicklung repräsentiere die Synthese eines neuen Proteins. (18, 19).

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb an Experimenten mit fötalen, neonatalen und adulten Ratten die Frage untersucht, ob auch andere Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels pränatal und postnatal verschiedene Michaelis-Konstanten aufweisen. Da S c h m i d t und S c h m i d t in ihrer Arbeit über optimale Reaktionsbedingungen für Enzym-Aktivitätsbestimmungen auf die Wichtigkeit der richtigen Substratkonzentrationen hinwiesen (13) und U. S t a v e die Bedeutung geeigneter Substratkonzentrationen für Enzymbestimmungen in sich noch entwickelnden Geweben hervorhob (15), wurde dieses Problem an Hand der ermittelten Ergebnisse (Aktivitätsmessungen und  $K_m$ -Bestimmungen) sozusagen retrograd berücksichtigt und überprüft. Dabei konnten mit Hilfe der Michaelis-Konstanten auf einfache Weise die optimalen Substratkonzentrationen für die verschiedenen Enzymassays in allen Altersgruppen ermittelt werden.

Tabelle 15: Sie veranschaulicht die Prüfung der für die Leber von adulten Ratten zusammengestellten Enzymassays auf ihre Brauchbarkeit auch für fötales Rattenlebergewebe. An Hand von Rattenlebern des 22. und 23. Fötaltages wurden die durch höchste Substratkonzentrationen, welche auch für die adulten Lebern herangezogen wurden, erreichten Aktivitäten mit der theoretisch zu erreichenden Maximalgeschwindigkeit verglichen.

| Enzym           | (S) <sub>max</sub> | $\bar{v}$ (μmol/g/min) | $\bar{v}_{max}$ | $\frac{\bar{v}}{\bar{v}_{max}}$ (%) | (S) <sub>max</sub> bei<br>S c h a u b |
|-----------------|--------------------|------------------------|-----------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| PGM             | 1,0 mM             | 69,43                  | 67,11           | 100                                 | 2,0 mM                                |
| G-6-PDH         | 0,6 mM             | 2,61                   | 2,71            | 96,3                                | 2,0 mM                                |
| 6-P-GDH         | 0,2 mM             | 3,16                   | 3,33            | 94,8                                | 0,6 mM                                |
| PGI             | 1,2 mM             | 61,24                  | 65,35           | 93,7                                | 2,0 mM                                |
| Amylo-1,6-Gl.   | 10,0 mg/ml         | 0,86                   | 0,92            | 93,2                                | -----                                 |
| Phosphoryl.a    | 75,0 mM            | 19,09                  | 20,53           | 92,9                                | 100,0 mM                              |
| F-6-PK          | 1,2 mM             | 2,72                   | 3,01            | 90,3                                | 2,0 mM                                |
| F-1,6-DPase     | 0,1 mM             | 2,99                   | 3,38            | 88,4                                | 1,0 mM                                |
| Phosphoryl.opt. | 0,6 mg/ml          | 0,68                   | 0,77            | 88,3                                | 1,0 mg/ml                             |
| α-Glukosidase   | 2,0 mg/ml          | 0,30                   | 0,38            | 79,7                                | 10,0 mg/ml                            |
| Phosphoryl.b    | 75,0 mM            | 10,73                  | 17,00           | 63,1                                | 100,0 mM                              |
| Glyk.synth.ase  | 8,3 mM             | 4,02                   | 6,62            | 60,7                                | 9,5 mM                                |
| G-6-Pase        | 25,0 mM            | 5,17                   | 9,80            | 52,7                                | 100,0 mM                              |

Die angegebenen Aktivitäten sind in Rattenlebergewebe vom 22. und 23. Fötaltag gemessen worden.

$\bar{v}$ : Mittelwert aller gemessenen  $v$

$\bar{v}_{max}$ : Mittelwert aller errechneten, theoretischen  $v_{max}$

(S)<sub>max</sub>: Höchste verwendete Substratkonzentration

Wie Tabelle 15 zeigt, war das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeit bei der größten im Test verwendeten Substratkonzentration zu der rein theoretisch zu erreichenden Maximalgeschwindigkeit befriedigend, denn in den meisten Fällen wurden annähernd 90 Prozent der theoretisch möglichen Maximalgeschwindigkeit erreicht, was für die meisten praktischen Untersuchungen ausreicht (7). Da sich zur Bestimmung der Michaelis-Konstante vor allem niedrige Substratkonzentrationen eignen, blieb man in den übrigen Fällen, die aber immer noch über 50 Prozent lagen, bei denselben Substratkonzentra-

tionen, die bereits bei Lebergewebe von adulten Ratten Verwendung fanden.

Eine andere Möglichkeit zur Bestimmung optimaler Substratkonzentrationen für alle praktischen Zwecke, bei denen die Reaktionsgeschwindigkeit unabhängig von der Substratkonzentration sein soll, ist durch die Kenntnis der Michaelis-Konstante eines Enzyms für ein bestimmtes Gewebe einer Spezies gegeben. Die Reaktionsgeschwindigkeit kann nämlich dann als unabhängig von der Substratkonzentration betrachtet werden, wenn die Substratkonzentration wenigstens 10 mal größer als die Michaelis-Konstante ist. (7). Dazu folgende Tabelle:

| Enzym u. Gruppe    | (S) <sub>max</sub>     | K <sub>m</sub>         | Ist-F. | Opt. (S)               | (S) <sub>max</sub> b. Schaub |
|--------------------|------------------------|------------------------|--------|------------------------|------------------------------|
| <u>G-6-PDH</u>     |                        |                        |        |                        |                              |
| 15. u. 16. FT.     | 6,0x10 <sup>-4</sup> M | 3,3x10 <sup>-5</sup> M | 17,7   | 3,3x10 <sup>-4</sup> M | 2,0x10 <sup>-3</sup> M       |
| 22. u. 23. FT.     | "                      | 3,8x10 <sup>-5</sup> M | 15,6   | 3,8x10 <sup>-4</sup> M | "                            |
| 1. LT.             | "                      | 3,3x10 <sup>-5</sup> M | 17,7   | 3,3x10 <sup>-4</sup> M | "                            |
| 20. LT.            | "                      | 2,7x10 <sup>-5</sup> M | 20,9   | 2,7x10 <sup>-4</sup> M | "                            |
| <u>6-P-GDH</u>     |                        |                        |        |                        |                              |
| 15. u. 16. FT.     | 2,0x10 <sup>-4</sup> M | 1,9x10 <sup>-5</sup> M | 10     | 1,9x10 <sup>-4</sup> M | 6,0x10 <sup>-4</sup> M       |
| 22. u. 23. FT.     | "                      | 1,1x10 <sup>-5</sup> M | 16,7   | 1,1x10 <sup>-4</sup> M | "                            |
| 1. LT.             | "                      | 1,0x10 <sup>-5</sup> M | 19,9   | 1,0x10 <sup>-4</sup> M | "                            |
| 20. LT.            | "                      | 3,1x10 <sup>-5</sup> M | 6,4    | 3,1x10 <sup>-4</sup> M | "                            |
| <u>PGI</u>         |                        |                        |        |                        |                              |
| 15. u. 16. FT.     | 1,2x10 <sup>-3</sup> M | 2,1x10 <sup>-4</sup> M | 5,6    | 2,1x10 <sup>-3</sup> M | 2,0x10 <sup>-3</sup> M       |
| 22. u. 23. FT.     | "                      | 1,9x10 <sup>-4</sup> M | 6,3    | 1,9x10 <sup>-3</sup> M | "                            |
| 1. LT.             | "                      | 1,5x10 <sup>-4</sup> M | 7,9    | 1,5x10 <sup>-3</sup> M | "                            |
| 20. LT.            | "                      | 1,0x10 <sup>-4</sup> M | 11,7   | 1,0x10 <sup>-3</sup> M | "                            |
| <u>PGM</u>         |                        |                        |        |                        |                              |
| 15. u. 16. FT.     | 1,0x10 <sup>-3</sup> M | 0,9x10 <sup>-4</sup> M | 10     | 1,0x10 <sup>-3</sup> M | 2,0x10 <sup>-3</sup> M       |
| 22. u. 23. FT.     | "                      | 1,1x10 <sup>-4</sup> M | 9      | 1,1x10 <sup>-3</sup> M | "                            |
| 1. LT.             | "                      | 1,3x10 <sup>-4</sup> M | 7,2    | 1,3x10 <sup>-3</sup> M | "                            |
| 20. LT.            | "                      | 1,2x10 <sup>-4</sup> M | 8,2    | 1,2x10 <sup>-3</sup> M | "                            |
| <u>F-1,6-DPase</u> |                        |                        |        |                        |                              |
| 22. u. 23. FT.     | 1,0x10 <sup>-4</sup> M | 1,4x10 <sup>-5</sup> M | 6,7    | 1,4x10 <sup>-4</sup> M | 1,0x10 <sup>-3</sup> M       |
| 1. LT.             | "                      | 2,2x10 <sup>-5</sup> M | 4,3    | 2,2x10 <sup>-4</sup> M | "                            |
| 20. LT.            | "                      | 1,9x10 <sup>-5</sup> M | 5,1    | 1,9x10 <sup>-4</sup> M | "                            |

| Enzym u. Gruppe         | (S) <sub>max</sub>     | K <sub>m</sub>         | Ist-F. | Opt. (S)               | (S) <sub>max</sub> <sup>b</sup> . Schaub |
|-------------------------|------------------------|------------------------|--------|------------------------|------------------------------------------|
| <u>F-6-PK</u>           |                        |                        |        |                        |                                          |
| 15.u.16.FT.             | 1,2x10 <sup>-3</sup> M | 2,1x10 <sup>-4</sup> M | 5,5    | 2,1x10 <sup>-3</sup> M | 2,0x10 <sup>-3</sup> M                   |
| 22.u.23.FT.             | "                      | 1,7x10 <sup>-4</sup> M | 6,8    | 1,7x10 <sup>-3</sup> M | "                                        |
| 1.LT.                   | "                      | 1,8x10 <sup>-4</sup> M | 6,5    | 1,8x10 <sup>-3</sup> M | "                                        |
| 20.LT.                  | "                      | 1,1x10 <sup>-4</sup> M | 10,8   | 1,1x10 <sup>-3</sup> M | "                                        |
| <u>Phosphoryl. opt.</u> |                        |                        |        |                        |                                          |
| 15.u.16.FT.             | 0,6mg/ml               | 0,09mg/ml              | 6,7    | 0,9mg/ml               | 1,0mg/ml                                 |
| 22.u.23.FT.             | "                      | 0,10mg/ml              | 6,0    | 1,0mg/ml               | "                                        |
| 1.LT.                   | "                      | 0,06mg/ml              | 8,8    | 0,6mg/ml               | "                                        |
| 20.LT.                  | "                      | 0,06mg/ml              | 9,7    | 0,6mg/ml               | "                                        |
| <u>Phosphoryl. a</u>    |                        |                        |        |                        |                                          |
| 15.u.16.FT.             | 7,5x10 <sup>-2</sup> M | 1,1x10 <sup>-2</sup> M | 6,6    | 1,1x10 <sup>-1</sup> M | 1,0x10 <sup>-1</sup> M                   |
| 22.u.23.FT.             | "                      | 1,6x10 <sup>-2</sup> M | 4,6    | 1,6x10 <sup>-1</sup> M | "                                        |
| 1.LT.                   | "                      | 1,4x10 <sup>-2</sup> M | 5,4    | 1,4x10 <sup>-1</sup> M | "                                        |
| 20.LT.                  | "                      | 1,5x10 <sup>-2</sup> M | 4,8    | 1,5x10 <sup>-1</sup> M | "                                        |
| <u>Phosphoryl. b</u>    |                        |                        |        |                        |                                          |
| 15.u.16.FT.             | 7,5x10 <sup>-2</sup> M | 0,7x10 <sup>-2</sup> M | 9,9    | 7,6x10 <sup>-2</sup> M | 1,0x10 <sup>-1</sup> M                   |
| 22.u.23.FT.             | "                      | 5,6x10 <sup>-2</sup> M | 1,3    | 5,6x10 <sup>-1</sup> M | "                                        |
| 1.LT.                   | "                      | 1,1x10 <sup>-2</sup> M | 6,4    | 1,1x10 <sup>-1</sup> M | "                                        |
| 20.LT.                  | "                      | 2,2x10 <sup>-2</sup> M | 3,3    | 2,2x10 <sup>-1</sup> M | "                                        |
| <u>Glyk. synth. ase</u> |                        |                        |        |                        |                                          |
| 15.u.16.FT.             | 8,3x10 <sup>-3</sup> M | 4,0x10 <sup>-3</sup> M | 2      | 4,0x10 <sup>-2</sup> M | 9,5x10 <sup>-3</sup> M                   |
| 22.u.23.FT.             | "                      | 5,2x10 <sup>-3</sup> M | 1,5    | 5,2x10 <sup>-2</sup> M | "                                        |
| 1.LT.                   | "                      | 2,0x10 <sup>-2</sup> M | ---    | 2,0x10 <sup>-1</sup> M | "                                        |
| 20.LT.                  | "                      | 5,4x10 <sup>-3</sup> M | 1,5    | 5,4x10 <sup>-2</sup> M | "                                        |
| <u>G-6-Pase</u>         |                        |                        |        |                        |                                          |
| 22.u.23.FT.             | 2,5x10 <sup>-2</sup> M | 2,8x10 <sup>-2</sup> M | ---    | 2,8x10 <sup>-1</sup> M | 1,0x10 <sup>-1</sup> M                   |
| 1.LT.                   | "                      | 3,0x10 <sup>-2</sup> M | ---    | 3,0x10 <sup>-1</sup> M | "                                        |
| 20.LT.                  | "                      | 2,7x10 <sup>-2</sup> M | ---    | 2,7x10 <sup>-1</sup> M | "                                        |
| <u>α-Glukosidase</u>    |                        |                        |        |                        |                                          |
| 22.u.23.FT.             | 2,0mg/ml               | 0,70mg/ml              | 2,8    | 7,0mg/ml               | 10,0mg/ml                                |
| 1.LT.                   | "                      | 0,78mg/ml              | 2,5    | 7,8mg/ml               | "                                        |
| 20.LT.                  | "                      | 0,57mg/ml              | 3,5    | 5,7mg/ml               | "                                        |
| <u>Amylo-1,6-Gluk</u>   |                        |                        |        |                        |                                          |
| 22.u.23.FT.             | 10,0mg/ml              | 1,15mg/ml              | 8,7    | 11,5mg/ml              | -----                                    |
| 1.LT.                   | "                      | 1,31mg/ml              | 7,6    | 13,1mg/ml              | -----                                    |
| 20.LT.                  | "                      | 0,67mg/ml              | 15     | 6,7mg/ml               | -----                                    |

Tabelle 16: Erklärung umseitig!

Tabelle 16: Optimale Substratkonzentrationen für verschiedene Enzymbestimmungen in der Leber von fötalen und neugeborenen Ratten. Gegenüberstellung der im Test verwendeten höchsten Substratkonzentrationen und der bei S c h a u b angegebenen Substratkonzentrationen (11) mit den optimalen Substratkonzentrationen.

In der ersten Rubrik sind die untersuchten Enzyme und die jeweiligen Gruppen angegeben.

In der zweiten Rubrik ist  $(S)_{\max}$  aufgeführt, welches die höchste im Test verwendete Substratkonzentration darstellt.

Die dritte Rubrik gibt die ermittelten Michaelis-Konstanten an.

In der vierten Rubrik wird der Ist-Faktor (Ist-F.) angegeben, der aufzeigt, um wieviel die zur Ermittlung der Michaelis-Konstante höchste Substratkonzentration größer als die  $K_m$  ist.

Die fünfte Rubrik führt die sogenannten optimalen Substratkonzentrationen (Opt.(S) ) auf, wobei  $Opt.(S) = 10 \times K_m$  gesetzt wurde.

In der letzten Rubrik sind die bei S c h a u b angegebenen Substratkonzentrationen aufgeführt, die er für die ontogenetischen Aktivitätsbestimmungen verwendete (11).

Eine Verwendung sehr hoher Konzentrationen ist manchmal unpraktisch oder auch unmöglich, da z.B. ein hoher Substratüberschuß die Reaktion hemmen kann und in anderen Fällen die Löslichkeit des Substrats begrenzt sein kann. Es wird als ausreichend betrachtet, wenn die Reaktionsgeschwindigkeit wenigstens 90% von der Maximalgeschwindigkeit erreicht. Bei dieser Reaktionsgeschwindigkeit sind die Substratkonzentrationen im allgemeinen etwa 10 bis 20 mal größer als die Michaelis-Konstanten (7).

Wie man aus der Tabelle 16 entnehmen kann, sind die größten bei der Ermittlung der Michaelis-Konstanten verwendeten Substratkonzentrationen in den meisten Fällen für praktische Zwecke nicht hoch genug angesetzt, wie aus dem Ist-Faktor hervorgeht, der sehr oft unter 10 liegt. Dies nämlich bedeutet, daß eine mindestens um den Faktor 10 größere Substratkonzentration als die Michaelis-Konstante nicht vorliegt und somit die Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration nicht unabhängig sein kann. Gerade diese Abhängigkeit bei niedrigeren Konzentrationen wird ja zur Bestimmung der Michaelis-Konstante genutzt.

Deshalb wurden die für praktische Enzymbestimmungen optimalen Substratkonzentrationen, welche sich aus den ermittelten Michaelis-Konstanten ergaben, in der Tabelle 16 gesondert aufgeführt, um sie mit anderen verwendeten Substratkonzentrationen vergleichen zu können.

Im Vergleich mit den bei S c h a u b angegebenen Substratkonzentrationen (11) und den optimalen Substratkonzentrationen ( $\text{Opt.}(S) = 10 \times K_m$ ) fallen folgende Differenzen auf: Für Messungen der Glukose-6-phosphatdehydrogenase erscheint die gewählte Substratkonzentration von 2,0 mM gegenüber der optimalen Konzentration von ungefähr 0,3 mM zu hoch. Ebenfalls zu hoch angesetzt erscheint für Bestimmungen der Fruktose-1,6-diphosphatase die angegebene Substratkonzentration von 1,0 mM bei einer optimalen Konzentration von circa 0,2 mM. Dagegen ist für die Testansätze der Glukose-6-phosphatase an Hand der optimalen Substratkonzentration eine etwa dreimal höhere Substratkonzentration notwendig, nämlich 300 mM. Bei allen übrigen Enzymen mit Ausnahme der Glykogensynthetase und der Phosphorylase b, welche gesondert zu besprechen sind, stimmen die bei S c h a u b verwendeten Substratkonzentrationen mit den hier aufgeführten optimalen Substratkonzentrationen überein.

Es erhebt sich die Frage, ob nicht in den differenzierenden Fällen bei nochmaligen Messungen unter Verwendung der hier ermittelten optimalen Substratkonzentrationen andere ontogenetische Enzym-Aktivitätskurven dargestellt werden können. Diese Diskussionsfrage wäre experimentell zu beantworten.

Von großem Interesse wäre die experimentelle Überprüfung dieses Problems besonders bei der Gesamtglykogensynthetase und der Phosphorylase b, die ja in den einzelnen Altersgruppen verschieden große Michaelis-Konstanten aufweisen und demnach entsprechend unterschiedlich hohe optimale Substratkonzentrationen benötigen.

Bei Testansätzen der Gesamtglykogensynthetase und der Phosphorylase b sollte man entsprechend der in der fötalen und neonatalen Entwicklungsperiode voneinander verschiedenen Michaelis-Konstanten konsequenterweise die altersspezifischen, optimalen Substratkonzentrationen anbieten, welche aus der Tabelle 16 gesondert zu entnehmen sind.

An Hand der  $K_m$ -Werte besteht für die übrigen hier untersuchten Enzyme keine Notwendigkeit, für Lebergewebe fötaler Ratten andere Substratkonzentrationen als für Lebergewebe neonataler oder adulter Ratten herzunehmen.

Tabelle 17 faßt die Ergebnisse noch einmal gekürzt zusammen:

| Enzym                 | 15.u.16.FT | 22.u.23.FT | 1.LT      | 20.LT     | $K_m = \dots$      |
|-----------------------|------------|------------|-----------|-----------|--------------------|
| G-6-PDH               | 3,38 n=13  | 3,84 n=14  | 3,38 n= 8 | 2,74 n= 8 | $\times 10^{-5} M$ |
| 6-P-GDH               | 1,98 n= 5  | 1,17 n= 8  | 1,02 n= 9 | 3,13 n= 4 | $\times 10^{-5} M$ |
| PGI                   | 2,13 n=12  | 1,91 n=14  | 1,52 n= 9 | 1,02 n=10 | $\times 10^{-4} M$ |
| PGM                   | 0,99 n=12  | 1,12 n=15  | 1,38 n=10 | 1,21 n=10 | $\times 10^{-4} M$ |
| F-1,6-DPase           | -----      | 1,49 n=14  | 2,29 n=10 | 1,96 n=10 | $\times 10^{-5} M$ |
| F-6-PK                | 2,18 n=12  | 1,76 n=15  | 1,85 n= 9 | 1,11 n= 7 | $\times 10^{-4} M$ |
| Phosphoryl.opt.       | 0,09 n= 7  | 0,10 n= 5  | 0,06 n= 7 | 0,06 n= 5 | mg/ml              |
| Phosphoryl.+AMP       | 1,13 n= 8  | 1,63 n=10  | 1,40 n=10 | 1,56 n= 7 | $\times 10^{-2} M$ |
| Phosphoryl.-AMP       | 0,76 n= 8  | 5,60 n= 9  | 1,17 n= 8 | 2,24 n=10 | $\times 10^{-2} M$ |
| Gesamtglyk.synth.     | 4,02 n=10  | 5,29 n=11  | 20,05 n=9 | 5,47 n= 9 | $\times 10^{-3} M$ |
| G-6-Pase              | -----      | 2,86 n= 8  | 3,03 n= 8 | 2,74 n= 8 | $\times 10^{-2} M$ |
| $\alpha$ -Glukosidase | -----      | 0,70 n=10  | 0,78 n=10 | 0,57 n=10 | mg/ml              |
| Amylo-1,6-Glukosi.    | -----      | 1,15 n=10  | 1,31 n= 9 | 0,67 n= 7 | mg/ml              |

Tabelle 17: Erläuterung umseitig!

Tabelle 17: Michaelis-Konstanten aller untersuchten Enzyme zu vier verschiedenen Zeitpunkten der Leberentwicklung bei fötalen und neugeborenen Ratten. Die angegebenen  $K_m$ -Werte in den vier Altersgruppen (1. Gruppe: 15. u. 16. Fötaltag, 2. Gruppe: 22. u. 23. Fötaltag, 3. Gruppe: 1. Lebenstag, 4. Gruppe: 20. Lebenstag) stellen Mittelwerte dar, die sich aus den Einzelbestimmungen ergaben.  $n$  = Anzahl der untersuchten Leberextrakte. In der letzten Spalte ist die Dimension der Michaeliskonstante in molar in einer Größenordnung von  $10^{-2}$  -  $10^{-5}$  M oder in mg/ml angegeben.

Wie schon gesagt, ergaben sich größere Veränderungen im Verhalten der Michaelis-Konstante nur bei der Phosphorylase b ( Phosphatfreisetzung ohne AMP ) und bei der Gesamtglykogensynthetase. Wenn man sich den Verlauf der Michaelis-Konstante der Phosphorylase b vom 15. Fötaltag bis zum 20. Lebenstag ansieht, fällt der Sprung von der niedrigen  $K_m$  von  $0,76 \times 10^{-2}$  M am 15. und 16. Fötaltag zu der etwa achtmal höheren  $K_m$  von  $5,6 \times 10^{-2}$  M am meisten auf, die am 22. und 23. Fötaltag erreicht wird. Das bedeutet also, daß die Affinität der Phosphorylase, und zwar die der nicht durch AMP aktivierten, zu ihrem Substrat G-1-P bis kurz vor dem Geburtstermin sehr stark abnimmt, da sie dann eine etwa achtmal höhere Substratkonzentration benötigt, um die halbe maximale Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen. Mit einer  $K_m$  von  $1,1 \times 10^{-2}$  M wird jedoch am 1. Lebenstag eine ähnlich niedrige Michaelis-Konstante wie am 15. bzw. 16. Fötaltag vorgefunden, während man am 20. Lebenstag mit einer  $K_m$  von  $2,24 \times 10^{-2}$  M wieder eine Abnahme der Affinität der Phosphorylase b zu ihrem Substrat G-1-P, und zwar um das Doppelte im Vergleich mit der  $K_m$  vom 1. Lebenstag, registrieren kann. Ein biologisch sinnvoller Grund, weshalb die Phosphorylase kurz vor der Geburt eine wesentlich geringere Affinität zu ihrem Substrat aufweist und somit auch weniger umgesetzt, ist vielleicht darin zu sehen, daß dem Neugeborenen auf diese Weise die lebenswichtigen Glykogenvorräte erhalten bleiben. Einschränkend muß jedoch hierzu bemerkt werden, daß die Ergebnisse bei der Phosphorylase a ( Phosphatfreisetzung mit AMP ), die wesentlich aktiver ist, einen ähnlichen Zusammenhang nicht signifikant erkennen lassen. Außerdem wird die Phosphorylase bei der Bestimmung nach H. e. r. a. s. in Richtung Glykogenaufbau und nicht in der Schlüsselrolle des Glykogenabbaus untersucht. Auch die Ergebnisse der optisch bestimmten Phosphorylase können die Ergebnisse bei der Phosphorylase b nicht eindeutig bestätigen.

Die Umwandlung der schwach aktiven Phosphorylase b in die hochaktive Phosphorylase a ist bekanntlich hormonabhängig. Dabei ist vor allem zyklisches AMP von Notwendigkeit. Die Bildung dieses zyklischen AMP wird durch die Hormone Adrenalin und Glukagon stimuliert. Vielleicht liegt hier der entscheidende Mechanismus zu der Erklärung der bei der Phosphorylase vorgefundenen Ergebnisse. Betrachtet man nämlich die  $K_m$ -Werte der Phosphorylase b isoliert, so ließe sich die geringe Affinität kurz vor der Geburt mit einem niedrigen Adrenalin- und Glukagonspiegel deuten, was wiederum im Sinne des Neugeborenen wäre, um ihm die Energiereserven zu erhalten.

Hierin würde sich auch das bei der Gesamtglykogensynthetase vorgefundene Ergebnis einfügen, welches am 1. Lebenstag eine circa vier bis fünfmal so hohe Michaelis-Konstante wie an den Fötaltagen und am 20. Lebenstag aufweist. Dies würde dafür sprechen, daß, wie bekannt, in den letzten Tagen vor dem Geburtstermin die Glykogenspeicher in der Leber des Föten aufgefüllt werden. Daß die Glykogensynthetase am 1. Lebenstag eine geringere Affinität zu ihrem Substrat besitzt, würde sich ebenfalls einordnen lassen, weil jetzt ex utero ein wesentlicher Baustein zur Glykogensynthese, nämlich das Angebot der mütterlichen Glukose, fehlt und somit der Abbau der pränatal errichteten Glykogenreserven Vorrang hat.

Ob die vorgefundenen unterschiedlichen Michaelis-Konstanten der Phosphorylase b und der Gesamtglykogensynthetase in der sich noch in der Entwicklung befindlichen Leber auf eine Enzymsynthese de novo schließen lassen dürfen, muß dahingestellt bleiben.

Bis h o p und L a r n e r fanden nämlich eine veränderte Michaelis-Konstante der Glykogensynthetase und Phosphorylase vor, als sie Hunden Insulin infundierten(3). Nach anschließender Glukagoninfusion war dieser Effekt weitgehend aufgehoben. Sie konnten nachweisen, daß durch Insulin die Glykogensynthetase aktiviert, die Phosphorylase deprimiert und durch Glukagon dieser Effekt aufgehoben wird(3).

Da bisher ähnliche ontogenetische Vergleichsstudien über das kinetische Verhalten von Leberenzymen des Kohlenhydratstoffwechsels fehlen, ist es sehr schwer, den Aussagewert der vorliegenden Resultate zu bestimmen. Inwieweit hier hormonelle Einflüsse vorhanden sind, muß weiteren Untersuchungen auf diesem Gebiet überlassen werden.

## Z u s a m m e n f a s s u n g

In vielen Experimenten konnte nachgewiesen werden, daß sich die Reaktionsgeschwindigkeiten sprich Aktivitäten von Enzymen während der pränatalen und postnatalen Entwicklung eines tierischen oder menschlichen Organismus ändern. Aber auch die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat kann sich während der Ontogenese unterschiedlich verhalten. Sie wird am besten durch die sogenannte Michaelis-Konstante ausgedrückt, welche der Substratkonzentration entspricht, bei der die halbe maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht ist.

Der Autor untersuchte an Experimenten mit fötalen und neugeborenen Ratten den Einfluß der Ontogenese auf die kinetischen Eigenschaften verschiedener Leberenzyme und ermittelte für diese Enzymassays die optimalen Substratkonzentrationen, die für praktische Zwecke benötigt werden. In den Versuchen wurde Lebergewebe von Ratten des 15. und 16. Fötaltages, 22. und 23. Fötaltages, 1. Lebenstages und 20. Lebenstages in Bezug auf das Verhalten der Michaelis-Konstanten folgender Enzyme untersucht: PGM, Glykogensynthetase, Phosphorylase,  $\alpha$ -Glukosidase, Amylo-1,6-Glukosidase, F-1,6-DPase, PGI, G-6-Pase, F-6-PK, G-6-PDH und 6-P-GDH.

Die Messung der Enzymaktivitäten wurde bei mindestens fünf verschiedenen Substratkonzentrationen vorgenommen. Anschließend wurde das sogenannte Lineweaver-Burk-Verfahren angewandt, wodurch eine exakte Bestimmung der Michaelis-Konstante ermöglicht wird. Zur statistischen Sicherung der dadurch in eine Gerade umgewandelten Substrat-Aktivitätskurve wurden der Korrelationskoeffizient und der Regressionskoeffizient ermittelt. Insgesamt wurden auf diese Art und Weise 450 statistisch gesicherte Michaelis-Konstanten ermittelt, wozu etwa 20 trächtige Ratten, 120 Föten und 60 neugeborene Ratten benötigt wurden.

Dabei kam es zu folgenden Ergebnissen: Die Michaelis-Konstanten in den zwei fötalen und neonatalen Gruppen zeigten bei elf von dreizehn analysierten Enzyme keine signifikanten Unterschiede. Größere Unterschiede im Verhalten der Michaelis-Konstante während der Entwicklungsperiode ergaben sich nur bei der Phosphorylase b ( nach Hers, ohne AMP ) und der Gesamtglykogensynthetase.

Die  $K_m$ -Werte der Phosphorylase b in den einzelnen Gruppen:  
15. u. 16. FT:  $K_m = 0,76 \times 10^{-2} \text{ M.}$  22. u. 23. FT:  $K_m = 5,60 \times 10^{-2} \text{ M.}$   
1. LT:  $K_m = 1,17 \times 10^{-2} \text{ M.}$  20. LT:  $K_m = 2,24 \times 10^{-2} \text{ M.}$

Die  $K_m$ -Werte der Gesamtglykogensynthetase ( mit G-6-P ):  
15.u.16.FT: $K_m = 4,02 \times 10^{-3}$  M. 22.u.23.FT: $K_m = 5,29 \times 10^{-3}$  M.  
1.LT: $K_m = 20,05 \times 10^{-3}$  M. 20.LT: $K_m = 5,47 \times 10^{-3}$  M.

Da die Michaelis-Konstanten der beiden oben genannten Enzyme zu den verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche Größen aufweisen, ergibt sich daraus die Notwendigkeit, dementsprechend auch verschieden hohe Substratkonzentrationen im Test anzubieten. Bei den übrigen elf untersuchten Enzymen kann man an Hand der  $K_m$ -Werte für Lebergewebe von fötalen Ratten dieselben Substratkonzentrationen wie für Lebergewebe von adulten bzw. neonatalen Ratten verwenden. Die in der Arbeit vorgefundenen optimalen Substratkonzentrationen wurden mit den bei Schaub verwendeten Substratkonzentrationen verglichen.

Es wurde diskutiert, ob das Verhalten der unterschiedlich hohen Michaelis-Konstanten der Phosphorylase b und der Gesamtglykogensynthetase in der sich noch entwickelnden Leber fötaler und neugeborener Ratten auf einen hormonellen Einfluß zurückzuführen ist.

# L i t e r a t u r

(nicht alphabetisch geordnet)

- ( 1 ) Ballard,F.J. and Oliver,I.T. : Kethexokinas,isoenzymes of Glucokinas and Glycogen synthesis from Hexoses in neonatal rat liver.Biochem.J.(1964)90,261.
- ( 2 ) Ballard,F.J. : Physiology of the perinatal period,Volume 1 Ed.by Uwe Stave,Fels Research Institute Yellow Springs,Ohio. Meredith Corporation,1970.Chapter 13:Carbohydrates.
- ( 3 ) Jonathan S.Bishop and Joseph Larnar : Rapid Activation - Inactivation of liver Uridine Diphosphate Glucose-Glycogen Transferase and Phosphorylase by Insulin and Glucagon in vivo. J.biol.chem.Vol.242 No 6,25(1967)1354-1356.
- ( 4 ) Jamdar,S.C. and Greengard Olga : Premature formation of Glucokinas in developing rat liver.J.of biol.chem.245,11, 2779-2783(1970).
- ( 5 ) Koblet,Hans : Physikalische Begriffe in der klinischen Biochemie.2.Auflage(1971)Georg-Thieme-Verlag Stuttgart.Kapitel Enzymkinetik 119-143.
- ( 6 ) Lineweaver,H.,D.Burk : The determination of enzyme dissociation Constants.J.Amer.chem.Soc.56(1934)658.
- ( 7 ) Mattenheimer,Hermann : Die Theorie des enzymatischen Tests. Böhlinger Mannheim GmbH,Biochemica 30M.373(1973).
- ( 8 ) Michaelis,L.,M.L.Menten : Die Kinetik der Invertinwirkung. Biochem.Z.49(1913)333.
- ( 9 ) Heather,J.,Shelley : Glykogen reserves and their Changes at birth and in anoxia.Brit.med.Bull.Vol.17 No 2,137-143(1961).
- ( 10 ) Sigman,Bernice,Robert L.Hawkins,and J.Tyson Tildon : Fetal development of the multiple forms of rat Hexokinas.Biochemical Medicine 6,29-35(1972).
- ( 11 ) Schaub,J.,Gutmann,I.and Lippert,H. : Development changes of glycolytic and gluconeogenic enzymes in fetal and neonatal rat liver.Horm.Metab.Res.4(1972)110-119.
- ( 12 ) Schaub,J.and I.Becker : The effect of Glucagon on the development of Glycogen phosphorylase and glycogen synthetase in rat liver.Bioch.et Biophys.Acta 279(1972)398-400.
- ( 13 ) Schmidt,E.und Schmidt,F.W. : Untersuchungen über optimale Reaktionsbedingungen für Enzym-Aktivitätsbestimmungen in Leber extrakten,in Extrakten anderer Organe und im Serum. I.Mitteilung zur Methodik von Enzymbestimmungen in menschlichen Organextrakten und im Serum.Enzym.biol.clin.2:201(1962).

- ( 14 ) Uwe Stave : Physiology of the perinatal period, Volume 1.  
Edited by Uwe Stave, Meredith Corporation, 1970,  
New York. Chapter 17: Enzyme Development in the  
liver.
- ( 15 ) Stave, U. : Importance of proper substrate concentration for  
enzyme assays in tissue homogenates for develop-  
mental studies. *Enzym. biol. clin.* 8: 21-32 (1967).
- ( 16 ) Walker, D.G. : The development of hepatic Hexokinases after  
Birth. *Biochem. J.* (1962) 84, 118p.
- ( 17 ) Walker, D.G. and Susan W. Eaton : Regulation of development of  
hepatic Glucokinase in the neonatal rat by diet. *Biochem. J.*  
(1967) 105, 771.
- ( 18 ) Walker, D.G. and Geraldine Holland : The development of hepatic  
Glucokinase in the neonatal rat. *Biochem. J.* (1965) 97, 845.
- ( 19 ) Walker, D.G. : Development of hepatic enzymes for the phos-  
phorylation of Glucose and Fructose. *Advance Enzyme Regulation*,  
3(1965) 163.
- ( 20 ) Bücher, T. 1962. Enzyme unter biologischem Aspekt. In Linneweh, F.,  
ed. *Erbliche Stoffwechselkrankheiten*. München, Urban und  
Schwarzenberg, pp. 125-141.
- ( 21 ) Bücher, T., Luh, W., Pette, D. : in Hoppe-Seyler-Thierfelder,  
*Handbuch der physiologischen und pathologisch-chem. Analyse*.  
10. Aufl., Bd. VIa, S. 292 Springer, Berlin (1964)
- ( 22 ) Latzko, E., Gibbs, M. : Fructose-1,6-diphosphatase. in: *Methoden  
der enzymatischen Analyse* ( H.U. Bergmeyer, Herausgeber )  
Verlag Chemie, Weinheim (1970)
- ( 23 ) Leloir, L.F., Goldemberg, S.H. : Synthesis of glycogen from  
uridine-diphosphate glucose in liver.  
*J. Biol. Chem.* 235: 919 (1960)
- ( 24 ) Hers, H.G. : Glycogen storage disease.  
*Adv. Metab. Disorders* 1: 1 und 335 (1964)
- ( 25 ) Fiske, C.H., Subbarow, J. : The colorimetric determination of  
phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375 (1925)
- ( 26 ) Hers, H.G. :  $\alpha$ -Glucosidase deficiency in generalized glycogen  
storage disease (Pompe's disease). *Biochem. J.* 86: 11 (1963)
- ( 27 ) Hers, H.G., Verhue, W., Van Hoof, F. : The determination of Amylo-  
1,6-Glucosidase. *European J. Biochem.* 2: 257 (1967)

## L e b e n s l a u f

Am 15.2.48 wurde ich in München als Sohn des praktischen Arztes Dr.med.Fred Tomm und seiner Ehefrau Anna Tomm,geb.Borowski, geboren.

Von 1954 - 1958 besuchte ich vier Klassen einer Volksschule in München.1958 trat ich dem Maximilians-Gymnasium in München bei, an dem ich mich 1967 der Reifeprüfung unterzog.

Von 1967 -1968 leistete ich ein Jahr meiner Wehrdienstpflicht bei der Bundeswehr ab,wo ich eine Sanitätsausbildung erhielt.

Im Herbst 1968 begann ich an der Universität München mit dem Medizinstudium.Nach fünf vorklinischen Semestern legte ich im April 1971 die ärztliche Vorprüfung und nach weiteren sechs klinischen Semestern im August 1974 mein Staatsexamen an der Universität München ab.

Von November 1974 - Oktober 1975 war ich als Medizinalassistent im Kreiskrankenhaus Fürstenfeldbruck sechs Monate auf der Internen Abteilung,vier Monate auf der Chirurgischen Abteilung und zwei Monate auf der Gynäkologischen und Geburtshilflichen Abteilung tätig.

Von November 1975 - Januar 1976 arbeitete ich als Assistenzarzt auf der Chirurgischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses Weilheim i.Obb.

Seit Februar 1976 bin ich als Assistenzarzt in der Ambulanz der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Fürstenfeldbruck beschäftigt.



THE STATE OF TEXAS

County of \_\_\_\_\_ State of Texas  
I, \_\_\_\_\_ of the County of \_\_\_\_\_ State of Texas, do hereby certify that \_\_\_\_\_ is the owner of the \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ of the County of \_\_\_\_\_ State of Texas, and that the same is subject to the lien of the \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ of the County of \_\_\_\_\_ State of Texas, and that the same is subject to the lien of the \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ of the County of \_\_\_\_\_ State of Texas, and that the same is subject to the lien of the \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ of the County of \_\_\_\_\_ State of Texas, and that the same is subject to the lien of the \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ of the County of \_\_\_\_\_ State of Texas, and that the same is subject to the lien of the \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ of the County of \_\_\_\_\_ State of Texas, and that the same is subject to the lien of the \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ of the County of \_\_\_\_\_ State of Texas, and that the same is subject to the lien of the \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ of the County of \_\_\_\_\_ State of Texas, and that the same is subject to the lien of the \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ of the County of \_\_\_\_\_ State of Texas, and that the same is subject to the lien of the \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ of the County of \_\_\_\_\_ State of Texas, and that the same is subject to the lien of the \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ of the County of \_\_\_\_\_ State of Texas, and that the same is subject to the lien of the \_\_\_\_\_



